

THESES

présentées

A LA FACULTE DES SCIENCES

DE L'UNIVERSITE DE NANTES

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE NANTES (Sciences)

par

Clair GENDRON

Première Thèse : RECHERCHES SUR LA FERMENTATION MALOLACTIQUE

Deuxième Thèse : PROPOSITIONS DONNEES PAR LA FACULTE

Soutenues le 26 Juin 1967 devant la Commission d'examen

M. J.M. DUNOYER Président

Melle G. DEBRAUX

MM. H. QUINIOU

J. PLOQUIN.....

} Examineurs

THESES

présentées

A LA FACULTE DES SCIENCES

DE L'UNIVERSITE DE NANTES

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE NANTES (Sciences)

par

Clair GENDRON

Première Thèse : RECHERCHES SUR LA FERMENTATION MALOLACTIQUE

Deuxième Thèse : PROPOSITIONS DONNEES PAR LA FACULTE

Soutenues le 26 Juin 1967 devant la Commission d'examen

M. J.M. DUNOYER Président

Melle G. DEBRAUX

MM. H. QUINIOU

J. PLOQUIN.....

} Examineurs

U N I V E R S I T E D E N A N T E S

FACULTE DES SCIENCES

oooooooo

Doyen : M. G. BRILLOUET

PROFESSEURS

Sciences Mathématiques

M. G. BRILLOUET	M. Y. PIRONNEAU
M. I. MOLINARO	M. R. RAFFIN
M. C. PAUC	M. E. RAVILLY
M. J. PETRUSCU	M. M. VIVIER

Sciences Physiques

M. P. AVIGNON	M. R. MEZENECV
M. A. BOULLOUD	M. S. MINN
M. L. COLLET	M. H. MOUTON

Sciences Chimiques

M. J.M. DUNOYER	M. Y. GRAFF
M. F. GOBIN	M. B. WOJTKOWIAK
M. H. QUINIOU	

Sciences Biologiques

Mlle G. DEBRAUX	M. J. PIERI
M. R. GARRIGUES	M. R. SELLIER

Sciences de la Terre

M. F. OTTMANN

oooooo

MAITRES DE CONFERENCES ET CHARGES D' ENSEIGNEMENT

Sciences Mathématiques

M. J. LAMEAU

M. A. JOLIVET

M. H. IBISCH

Sciences Physiques

M. J.P. BARDON

M. P. GUEVEL

M. G. GOUREAUX

M. W. LASKAR

M. J. GRANGE

Mlle S. OFFRET

Sciences Chimiques

M. J. JOLIVET

M. R. POINTEAU

M. G. MARTIN

M. J. ROUXEL

M. M. TOURNOUX

Sciences Biologiques

M. L. AMOURIQ

M. P. DUPONT

Mlle M. ASTIE

M. G. LE DOUARIN

Mme N. LE DOUARIN

Sciences de la Terre

M. P. CAVET

M. F. FORESTIER

Secrétaire principal : M. M. PAILLET

oooooooooooooooooooo

oooooooooooo

oooo

	pages
INTRODUCTION.....	
<u>P R E M I E R E P A R T I E</u>	1
<u>1.HISTORIQUE</u>	2
A)Travaux publiés sur la fermentation malolactique jusqu'en 1959.....	3
Tableau synoptique des publications arrêté à 1959...59 bis	
B)Travaux publiés sur la fermentation malolactique de 1959 aux recherches récentes.....	60
§ 1. <u>Origine des bacteries</u>	60
§ 2. <u>Processus de la fermentation malolactique</u>	61
§ 3. <u>Caractère de la fermentation malolactique</u>	62
§ 4. <u>Caractères communs aux germes</u>	63
§ 5. <u>Différences entre les germes</u>	64
§ 6. <u>Facteurs agissant sur les bacteries malolac-</u> <u>tiques</u>	71
1°) <u>FACTEURS BIOLOGIQUES</u> ,.....	71
a)Activateurs.....	71
b)Inhibiteurs.....	73
2°) <u>FACTEURS BIOCHIMIQUES & CHIMIQUES</u>	75
a)Facteurs que l'on peut classer comme agissant favorablement.....	75
b)Facteurs défavorables à la fermentation malolactique....	76

-Le tanin.....	76
-Le cuivre.....	77
c) Les vitamines.....	77
d) Les aminoacides.....	78
e) Facteurs divers dont l'influence n'est pas absolument déterminée.....	82
-Le SO ₂	82
-Le phosphate d'ammoniaque.....	83
-L'alcool.....	83
-Le lysozyme.....	83
3°) <u>FACTEURS PHYSIQUES</u>	84
§ 7. Répercussions de l'action des bactéries malo- lactiques sur le milieu.....	85
2. <u>APERÇU DES MOYENS POUR OBTENIR LA FERMENTATION</u> <u>MALOLACTIQUE</u>	85 bis
3. <u>BIBLIOGRAPHIE DES TRAVAUX AYANT POUR OBJET D'ÉVITER</u> <u>LA FERMENTATION MALOLACTIQUE</u>	87 bis
4. <u>DISCUSSION DES TRAVAUX PRÉCITÉS</u>	88 bis
5. <u>CONCLUSIONS DE LA BIBLIOGRAPHIE</u>	95
 <u>D E U X I E M E P A R T I E</u>	
 <u>T R A V A U X</u>	
<u>P E R S O N N E L S</u>	96
 <u>C H A P I T R E 1.</u>	
<u>PRELIMINAIRES</u>	96 bis
A) Observations effectuées dans le vignoble.....	97
B) Dédutions de nos observations et bases générales émises au départ de nos recherches....	98
 <u>C H A P I T R E 2.</u>	
<u>MATERIEL ET TECHNIQUES</u>	99 bis
1) <u>Méthodes analytiques</u>	100
A. Acides.....	100
§ 1. Aminoacides.....	100
§ 2. Acides organiques.....	109
§ 3. Acidité de titration.....	110

§ 4.Acidité volatile.....	111
B.Sucres.....	112
C.Azote.....	112
§ 1.Azote total.....	112
§ 2.Azote minéral.....	112 bis
D.Matières tannoïdes,polyphénols.....	113
§ 1.Indice de permanganate.....	113
§ 2.Test de polyphénols.....	II4
E.Fer.....	114
F.Matières pectiques.....	115
G.Anhydride sulfureux.....	115
§ 1.Anhydride sulfureux libre.....	115
§ 2.Anhydride sulfureux total.....	116
H.Microscopie.....	116
§ 1.Examens généraux.....	116
§ 2.Numérations cellulaires.....	116
I.Mesures electrometriques,pH,rH.....	117
J.Alcool.....	117
§ 1.Vins.....	117
§ 2.Moûts.....	118
2) <u>Materiel</u>	118
A.Appareillage.....	118
B.Prélèvements.....	119

C H A P I T R E 3.

<u>HISTORIQUE DES TRAVAUX PERSONNELS</u>	119 bis
--	---------

C H A P I T R E 4.

<u>EVOLUTION DE L'APPLICATION PRATIQUE A LA VITICULTURE</u> <u>DE NOTRE TECHNIQUE DE FERMENTATION</u>	122 bis
--	---------

CHAPITRE 5.RECHERCHES ET TRAVAUX PERSONNELS DE LABORATOIRE.....I24 bis1) ETUDES D'ORIENTATION.....I25

A.Essais "W".....I25

B.Essais "X".....I27

2) ETUDE DE LA BIOCHIMIE DU PHENOMENE
MALOLACTIQUE.....I29DESCRIPTION DE NOTRE TECHNIQUE DE VINIFICATION..I29A.Essais "B"

§ 1.Préliminaires.....I29

§ 2.Fermentation alcoolique.....I32

§ 3.Evolution du pH pendant la fermentation
alcoolique...I33§ 4.Variation du potentiel d'oxydo-reduction
pendant la fermentation alcoolique....I40§ 5.Evolution malolactique et phénomènes liés
a cette dégradation.....I42

B.Essais "T".....I49

C.Conclusions des essais "B" & "T".....I55

D.Essais "D".....I56

E.Essais "H".....I65

F.Essais "P".....I69

G.Essais "G".....I71

H.Essais "E₃S" & "E₃PS".....I733) DEDUCTIONS ET CONCLUSIONS DE NOS TRAVAUX
PRECITES...I76CHAPITRE 6.ETUDES SUR LE PRESSURAGE DES RAISINS.....I771) Essais "L".....I78

§ 1.Matériel.....I78

	pages
a) Biochimie.....	I79
b) Microbiologie.....	I85
§ 3.Conclusions.....	I88
2) <u>Essais "F"</u>	I88
§ 1.Preparation du matériel.....	I88
§ 2.Recherches.....	I89
a) Biochimie.....	I89
b) Botanique.....	I92 bis
c) Influence des aminoacides libérés.....	I93
d) Répercussions sur la fermentation alcoolique..	I96
§ 3.Conclusions.....	I98
3) <u>Essais "E"</u>	I99

C H A P I T R E 7.

ESSAIS DE MISE EN EVIDENCE D'UN ANTAGONISME

	<u>MICROBIEN</u>	20I bis
1) <u>Préliminaires</u>		202
2) <u>Etude de facteurs extraits par solvant</u> <u>organiques</u> .		203
§ 1.Mode opératoire.....		203
§ 2.Expérimentation sur moûts.....		205
§ 3.Expérimentation sur vins.....		207
3) <u>Facteurs isolés par voie aqueuse</u>		211
§ 1.Expérimentation sur moûts.....		211
§ 2.Expérimentation sur vins.....		212
§ 3.Conclusions.....		216

TROISIEME PARTIEDISCUSSION

&

CONCLUSIONS GENERALES.....217DISCUSSION.....217 bis

§ 1. Notre méthode de vinification.....218

§ 2. Rôle de l'arginine en oenologie.....220

§ 3. Point de vue médical.....221

§ 4. Remarque particulière.....222 bis

CONCLUSIONS GENERALES.....223GLOSSAIRE.....225BIBLIOGRAPHIE.....228INDEX ALPHABETIQUE.....229INDEX PAR ORDRE DE CITATION.....257.

INTRODUCTION

Plus on réfléchira aux causes des maladies des vins, plus on se convaincra que l'art de la vinification et les soins que l'expérience des siècles a proclamés nécessaires ont principalement leur raison d'être dans les conditions mêmes de la vie et de la manière d'agir des parasites du vin, de telle sorte que si l'on pouvait arriver à supprimer par une opération pratique très simple, les causes des altérations spontanées des vins, on pourrait, sans nul doute, fonder un art nouveau de faire le vin, beaucoup moins dispendieux que celui qui est suivi depuis si longtemps, bien plus efficace surtout pour supprimer les pertes qu'occasionnent les maladies des vins, très propre par conséquent à l'extension de cette denrée.

Louis PASTEUR.

(études sur le vin, 1873)
p.53., Paris.

Les caractères très appauvris de certains Muscadets et Gros-Plants, ont depuis quelques années attiré notre attention; c'est l'objet de l'étude que nous allons développer.

Cet affaiblissement très marqué du bouquet, est indépendant de la qualité des récoltes, puisqu'on le déplore aussi bien dans les années de bonne maturité, productrices des grands millésimes. Des analyses effectuées sur ces vins, nous ont permis de diagnostiquer qu'ils avaient subi très tôt la fermentation malolactique.

Pour ces deux types de vins secs de Loire Atlantique, il est indispensable de conserver l'acidité initiale qu'ils présentent en

jus de raisin, (compte tenu de la chute normale de celle-ci pendant la fermentation alcoolique) pour l'exaltation optimale de leurs caractères organoleptiques. En tant que vins secs, ils ne peuvent être vendangés en période de surmaturation, la fin de maturité représentant une date d'extrême limite. Il en découle que l'acidité totale des moûts comprend, à ce stade, une part encore importante d'acide malique.

La transformation biologique de l'acide malique en acide lactique, appelée communément fermentation malolactique, entraîne un abaissement très important de l'acidité de titration, dont les effets sont désastreux pour certains vins. Dans le vignoble Nantais, il faut absolument éviter cette désacidification biologique pour les raisons suivantes:

1°) Certains Muscadets après disparition d'acide malique présentent une acidité totale anormale de 2,60 à 2,90 g/l au lieu de 4,50 g/l environ, (exprimée en H_2SO_4) ce qui déclenche un évanouissement progressif des meilleurs facteurs gustatifs ou même une suppression totale du bouquet, comme nous l'avons remarqué à plusieurs reprises. Sans être anormalement très élevée, l'acidité moyenne de ces vins, joue donc le rôle de support des composants aromatiques.

2°) Les Muscadets ainsi "rétrogradés" sont récalcitrants à la clarification naturelle par repos; un trouble persiste; maintenant en suspension les bactéries lactiques, comme le prouve un examen microscopique que l'on peut effectuer sur un tel vin même après 6 à 8 mois. Il y a formation probable d'un colloïde protecteur. On sait par MILLIS, HUSAIN, HALL et WALKER(1) que l'on peut trouver dans les cidres des Lactobacillus qui produisent du mucilage; la formation du colloïde nécessite la présence d'un sucre: glucose, lévulose et surtout maltose. Ce phénomène ou effet Tyndall est particulièrement gênant ici, car la mise en bouteilles doit se faire en Mars ou Avril (qui suivent les vendanges) pour garder les caractères de jeunesse et fraîcheur au vin.

3°) La faible acidité de titration de ces vins, lorsqu'ils ont subi la rétrogradation malolactique, les rend très sensibles à la casse ferrique.

4°) Enfin une raison d'ordre médical, SERVIERE (2), dont nous parlerons en fin d'ouvrage, nous a incités à pousser plus à fond notre technique de conservation de l'acide malique.

A l'heure où nous écrivons ces lignes, le problème de la fermentation malolactique est très à l'ordre du jour, pour ne pas

dire au premier plan de l'oenologie moderne. Ceci est prouvé par des commissions récentes de 1964 comme : la Commission de l'Office International de la Vigne et du Vin, sur "Les méthodes d'isolement, de culture et de classification des bactéries malolactiques" (3); la Sous-commission de Microbiologie du vin à l'O.I.V. qui s'est arrêtée particulièrement à l'étude des bactéries malolactiques. (4). Les nombreuses références bibliographiques citées dans l'historique et réparties dans les revues Françaises et Etrangères, montrent quel intérêt soulève de problème. Enfin, dans le proche avenir, le Deuxième Symposium International d'Oenologie qui doit se tenir à Bordeaux du 13 au 17 Juin 1967, a laissé une large part à l'étude de ces microorganismes.

Jusqu'à ce jour, à notre connaissance, la solution n'est pas trouvée, tant pour provoquer la rétrogradation par ensemencement, que pour l'arrêter ou l'éviter.

La technique que nous avons mise au point et que nous développerons dans la seconde partie, apporte enfin une solution pour bloquer la fermentation malolactique, problème crucial jusqu'alors pour la viticulture de notre région.

L'exposé de nos recherches est divisé en 3 parties:

Dans la première partie nous avons traité la bibliographie des publications faisant état du phénomène malolactique ou l'analysant plus en détail; publications qui étaient distribuées dans de nombreux ouvrages et revues.

Au début de cette rubrique nous avons cité les mises au point concernant cette dégradation, selon leur ordre chronologique jusqu'en 1959, date du Colloque Oenologique de Mâcon, le premier orienté sur la décarboxylation de l'acide malique.

Ensuite, pour faciliter la consultation de cette revue rétrospective, nous avons établi un tableau synoptique de toute la bibliographie comparative parue jusqu'à cette date. (1959).

Nous avons continué l'historique des travaux en considérant cette fois, les études publiées jusqu'à ce jour, vis à vis des phénomènes sur lesquels l'attention avait été portée lors de ce colloque. A cette fin, nous avons respecté l'ordre de ce tableau synoptique en en reprenant systématiquement tous les points un à un.

Dans la seconde partie réservée à nos recherches personnelles, nous exposons en premier lieu le matériel et les techniques opératoires utilisés, y compris celles que nous avons mises au point.

Au chapitre IV de cette seconde partie, nous relatons les résultats de notre conduite de vinification appliquée à la viticulture de 1961 à 1965. Les essais préliminaires indispensables pour l'établissement de notre technique d'élaboration des vins, font suite à cet exposé de nos résultats au plan viticole.

Le chapitre V est consacré à la description de notre méthode de fermentation. Les conséquences qui en résultent et les effets biochimiques qui en découlent sont analysés. Nous montrons que c'est principalement sur les aminoacides et en particulier sur l'arginine et l'alanine que notre technique de vinification apporte des perturbations. On peut déduire que l'on provoque une carence en ces deux acides aminés. Nous traitons ensuite le rôle que l'on doit attribuer à l'arginine dans ces dégradations; par diverses expérimentations nous prouvons son rôle activateur.

Cette hypothèse se trouve vérifiée par d'autres essais qui y font suite et plus particulièrement par les études sur le pressurage des raisins montrant qu'en enrichissant un moût en arginine et en alanine, on prédispose celui-ci à la rétrogradation malolactique. (l'enrichissement en ces deux éléments se réalise dans les jus de fin de serrage).

Nous terminons cette seconde partie par la recherche d'un antagonisme levure-bactérie, propre à notre méthode de fermentation. Nous indiquons qu'un facteur bactériostatique semble exister dans cette pratique d'élaboration des vins secs.

Dans la troisième partie nous comparons nos résultats avec les études déjà publiées sur la rétrogradation de l'acide malique et sur le développement des bactéries lactiques dans les vins.

Nous terminons par les conclusions générales.

Les travaux se rapportant à nos recherches ont été effectués pour la plus grande part, au Laboratoire de Botanique Générale de la Faculté des Sciences de Nantes, dirigé par Mademoiselle le Professeur G.DEBRAUX qui a bien voulu nous y accueillir avec spontanéité. Ses encouragements et son grand enthousiasme pour la recherche scientifique, en créant une ambiance de travail intense dans son laboratoire, ont stimulé nos études, nous communiquant ce désir d'approfondir chaque détail.

A l'heure de conclure nos recherches, nous adressons des remerciements émus à notre Maître, Mademoiselle le Professeur G.DEBRAUX. Nous lui sommes profondément reconnaissant et l'assurons d'une gratitude sincère.

Nous remercions Monsieur le Professeur J.M.DUNOYER de la Faculté des Sciences de Nantes, d'avoir bien voulu nous faire le très grand honneur de présider notre Jury d'Examen.

Nos remerciements s'adressent également à Monsieur le Professeur H.QUINIOU de la Faculté des Sciences de Nantes qui a bien voulu accepter de faire partie de notre Jury.

Nous assurons de notre gratitude Monsieur le Professeur J.PLOQUIN de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Nantes pour les conseils qu'il nous a prodigués avec grande amabilité, qu'il en soit ici remercié.

A Monsieur le Professeur J.RIBEREAU-GAYON de la Faculté des Sciences de Bordeaux, Directeur de la Station Agronomique et Oenologique de Bordeaux, et à Monsieur E.PEYNAUD Chef du Service des Recherches de la Station Agronomique et Oenologique de Bordeaux qui ont bien voulu nous autoriser à publier quatre photographies extraites de leur important Traité d'Oenologie, nous exprimons nos respectueux remerciements.

Nous adressons une pensée de gratitude très amicale à Monsieur R.HAMON Aide technique au Laboratoire de Botanique Générale de la Faculté des Sciences de Nantes en particulier pour son aide dans nos études sur le pressurage et pour sa grande amabilité à nous sacrifier quelques heures lorsque nous lui en faisons la demande.

PREMIERE

PARTIE

HISTORIQUE

&

BIBLIOGRAPHIE

1

H I S T O R I Q U E

A) Travaux publiés sur la fermentation malolactique jusqu'en 1959.

(Y compris quelques mémoires de microbiologie générale en relation avec la désacidification par décarboxylation de l'acide malique).

Pour bien comprendre les recherches effectuées sur ce sujet, pour pouvoir les juger, en tirer les conclusions et aussi les situer dans le temps; il nous a semblé indispensable de faire une revue rétrospective des études antérieures. Pour suivre plus facilement l'évolution générale, les notes sont citées dans leur ordre chronologique jusqu'au Colloque Oenologique de Mâcon en 1959, qui a été la première réunion orientée sur la désacidification du vin par les bactéries.

La fermentation malolactique étant une dégradation de l'acide malique par des "bactéries", il est normal de mentionner ici la première observation faite sur celles-ci; au sens général du terme.

En 1676, un drapier Hollandais de Delft VAN LEEUWENHOECK (5) remarqua pour la première fois des bactéries sur un microscope qu'il avait fabriqué lui-même pour satisfaire sa curiosité. Il prouva ses examens microscopiques en envoyant ses résultats, accompagnés de dessins, à la Royal Society de Londres.

C'est dans un ouvrage sur "l'Histoire de la ville de Beaune et de ses Antiquités " écrit par l'abbé GANDELOT en 1772 (6), que l'on trouve la première constatation du phénomène de rétrogradation de l'acide malique, sans pour autant l'expliquer. Cet auteur écrivait : « Après une première fermentation qui dure deux à trois semaines, il s'en fait d'autres plus ou moins sensibles en certains temps, selon la nature des terrains qui ont produit la liqueur. Nous avons des vignobles, où lorsque le raisin est en fleur ou qu'il commence à mûrir, le vin devient louche, nébuleux. Ceux qui ne connaissent pas ce travail, croient le vin gâté; mais quelques jours après, il reprend son état et paraît meilleur qu'auparavant ». Cette remarque de l'abbé GANDELOT, bien qu'elle soit très ancienne, se rapporte certainement à la rétrogradation malolactique. Comme nous le savons, celle-ci se déclare souvent avec la légère augmentation de température du printemps. Les conclusions qu'il formule sont à l'opposé des nôtres, car dans la Bourgogne et le Bordelais, la fermentation malolactique est souhaitable pour l'assouplissement de leurs types de vins, à l'inverse de l'Alsace, de la Savoie et du Nantais où elle est redoutée. Comme l'indique FERRE (7), cette désacidification a été observée à l'époque par un auteur étranger aux phénomènes se produisant dans le vin, et ignorée par les oenologues de ce temps.

Les recherches sur cette dégradation , processus bactérien, ont été liées à l'étude des microorganismes, elle-même dépendant des progrès en chimie, optique et biochimie.

Ce sujet relève de la microbiologie générale surtout jusqu'en 1912, mais pour la clarté de l'exposé, nous nous sommes efforcés d'étudier en particulier les bactéries ayant un rôle sur l'acidité totale des vins.

En 1857, PASTEUR (8) fit de nombreuses recherches sur une fermentation défectueuse à la distillerie Bigo de Lille. Le grand savant prouva que la fermentation lactique était effectuée par un organisme vivant, tout comme la fermentation alcoolique était provoquée par la levure; (cette théorie des "organismes vivants", appelés microbes, étant très controversée à l'époque, en particulier par LIEBIG.) En 1858, PASTEUR publia un mémoire sur la fermentation lactique, cet ouvrage est resté la première pierre de la bactériologie.

Plus tard en 1861 BALARD (9) remarqua que l'acide lactique était présent, même dans les vins non altérés. Il l'identifia par la forme cristalline de son sel de zinc. Il avait aussi observé dans les vins tournés, des filaments analogues aux " filaments lactiques " de PASTEUR.

Peu de temps après, BERTHELOT et de FLEURIEU (10) notaient une forte diminution de l'acidité totale de vin par rapport au moût dont il provenait; chute qui était plus forte que celle provoquée par la précipitation du bitartrate de potasse. Cette observation fût effectuée en 1864, avant la parution des " Etudes sur le vin " de PASTEUR en 1866.

Une analyse critique des " Etudes sur le vin " de PASTEUR, fut faite en 1941 par RIBEREAU-GAYON (11) et reprise en 1961 par le même auteur en collaboration avec PEYNAUD (12). PASTEUR en 1866, (13) sans employer le terme " fermentation malolactique ", avait remarqué que les "maladies des vins " étaient causées par des microorganismes; observation très importante pour ce temps là. Pendant longtemps on a cru que tous les microbes étaient pathogènes. Le célèbre et premier microbiologiste en étudiant la "tourne", avec les conséquences physiques qu'elle entraîne, note un dépôt glutineux formé d'amas de filaments. Ces "ferments" en forme très allongée, sont comparables aux ferments lactiques. En fait, à la lumière de nos connaissances, ces "filaments" ne se rapportent pas nécessairement à la maladie de la tourne, mais à une action microbienne sur le sucre ou l'acide malique.

PASTEUR en analysant les caractéristiques de la maladie de l'amertume décrit les dépôts qu'il a examiné dans les vins devenus amers, de la façon suivante : « espèces de branchages, tout rameux, tout noueux, de diamètres plus ou moins larges, plus ou moins articulés, incolores ou faiblement colorés en rouge, d'une teinte claire vive ou d'une teinte brune très foncée » . La différence de diamètre des filaments dépend de la façon dont ils sont recouverts de matière colorante; cette dernière peut d'ailleurs être éliminée par addition d'acide ou d'alcool.

RIBEREAU-GAYON (11) compare des filaments de l'amertume non recouverts de matière colorante (soit par leur récente formation ou par traitement aux acides ou aux alcools) avec ceux représentés comme ferments de la tourne. Il trouve une légère différence de diamètre ($1,2\mu$ au lieu de $0,7\mu$) mais pense que les ferments reproduits par PASTEUR comme ceux de l'amertume sont en réalité des bactéries de la tourne. PASTEUR (13) lui-même dénote un manque de précisions, puisqu'il écrit : « La nature d'un ferment ne peut être rigoureusement établie que par sa fonction physiologique,

(et non par son aspect microscopique) et nous ne connaissons pas encore suffisamment celle du ferment des vins tournés. Je suis même porté à croire que l'on réunit sous l'expression de vin tourné, des maladies différentes auxquelles correspondent plus d'un ferment filiforme ». RIBEREAU-GAYON et PEYNAUD (I2) concluent que les bactéries décrites par l'auteur des "Etudes sur le vin", comme ferments de la tourne, doivent être des bactéries de la fermentation malolactique.

PASTEUR étudia la maladie de la graisse, celle de l'acescence et aussi celle de la fleur. Il montra que lorsque le *Mycoderma vini* (agent de la fleur) se développe, il empêche la prolifération du *Mycoderma aceti* qui forme l'acescence; c'est une première remarque de l'antagonisme microbien. Pour la classification des microorganismes, des précisions analytiques chimiques auraient été indispensables. Toutes ces difficultés n'avaient pas échappé à PASTEUR, c'est ce que lui-même, dès le début de son ouvrage, sous le titre « Opinions nouvelles sur la cause des maladies des vins » nous explique clairement: (I4) « Les principes que j'expose dans cet ouvrage, et que je crois avoir déduits d'une observation attentive des faits, sont tout autres que ceux que je viens de faire connaître ».

La meilleure synthèse des travaux de PASTEUR sur les causes et effets des maladies du vin est contenue dans cette phrase de l'un de ses ouvrages où il explique que dans les vins les maladies sont dues: « à la présence de végétations parasitaires microscopiques, qui trouvent dans le vin des conditions favorables à leur développement, et qui l'altèrent soit par soustraction de ce qu'elles lui enlèvent pour leur nourriture propre, soit principalement par la formation de nouveaux produits qui sont un effet même de la multiplication de ces parasites dans la masse du vin. »

Quel diagnostic pour l'époque, alors que tous croyaient qu'il s'agissait de réactions entre les éléments constitutifs du vin!

RIBEREAU-GAYON (11) en 1941 dans son excellente analyse des études de PASTEUR écrit: « Les discussions que PASTEUR dut soutenir ont perdu de leur actualité. Leur lecture permet d'opposer la sûreté et la netteté des assertions de PASTEUR, aux considérations approximatives et à l'évidente mauvaise foi de ses adversaires ». Plus loin il souligne que la synthèse des faits observés minutieusement par le grand savant « constituait par rapport aux idées antérieures un progrès inouï. CHAPTAL par exemple, dans son traité de ' L'art de faire le vin ' (1807), considérant que la fermentation alcoolique est due à l'action réciproque du sucre et du 'ferment', attribuait les maladies du vin à un excès de ferment subsistant après la

disparition du sucre. Par contre disait-il, si le sucre prédomine dans le moût sur le ferment, ce dernier est tout employé pour ne décomposer qu'une partie du sucre; le vin reste sucré et un tel vin peut être conservé sans altération aucune, aussi longtemps qu'on peut le désirer; pour prévenir l'acescence, CHAPTAL n'hésite pas à conseiller l'addition au vin de sucre ou de moût très sucré ». CHAPTAL indiquait là, sans s'en rendre compte, l'opération la plus favorable pour augmenter l'altération !

BOUSSINGAULT en 1868 remarquait dans les cidres une diminution d'acidité de 50%, mais là s'arrêtait l'observation. (I5)

La disparition de l'acide malique par voie biochimique a été étudiée la première fois par KULISCH en 1889, 1894 (I6) avec l'expérience suivante décrite par VENTRE (I7): « Abandonnant un vin au contact de levures, il constatait une diminution d'acidité totale, alors que dans les témoins pour lesquels le vin avait été stérilisé, il n'observait qu'une diminution insignifiante d'acidité ». KULISCH en tirait la conclusion suivante; que les levures attaquaient l'acide malique, mais il aurait du doser cet acide pour étayer ses conclusions. ORDONNEAU effectua ces dosages (I8), en 1891, et indiqua par analyses comparatives entre vins vieux et vins nouveaux, que le taux d'acide malique était décroissant au cours de leur conservation.

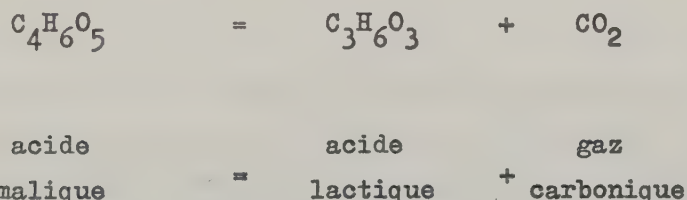
GAYON (I9), en 1897, avait bien remarqué une chute d'acidité totale assez brutale de 1,00 g/l, et correspondant à une apparition de bactéries ; mais cette observation faite pendant le contrôle de deux cuves en fermentation dans le Médoc, était interprétée comme une précipitation de bitartrate de potasse et l'apparition de bactéries due à une « altération plus ou moins profonde du liquide ». Voici le tableau analytique des cuves surveillées par GAYON (20), rapporté par RIBEREAU-GAYON et PEYNAUD (I2).

Temps écoulé depuis le chargement	Sucre restant g/l	Acidité totale	Acidité volatile	Bactéries par champ de microscope
PREMIERE CUVE				
2 jours	116	4,35	0,12	0
5 "	45	4,25	0,12	0
6 "	23	4,25	0,13	I à 2
7 "	6	3,19	0,21	25 à 30
10 "	3	3,15	0,35	30 à 35
13 "	1	3,15	0,36	35 à 40
DEUXIEME CUVE				
2 jours	104	4,25	0,10	0
5 "	29	4,25	0,10	0
6 "	4	4,47	0,12	0
7 "	1	4,20	0,17	4 à 5
8 "	I	3,35	0,23	20 à 25
13 "	I	3,40	0,45	50 à 60

(Tableau I)

La première colonne indique le nombre de jours après lequel le prélèvement a été fait. Ce nombre est compté depuis le chargement des cuves. Dans la dernière colonne est indiqué le nombre de bactéries par champ de microscope. La relation est nette entre la chute brutale d'acidité et la multiplication des bactéries. GAYON donnait l'explication suivante: «Quand la fermentation alcoolique se ralentit, on voit souvent apparaître des microbes variés qui déterminent une altération plus ou moins profonde du liquide; les plus connus et les mieux caractérisés sont le ferment mannitique et le ferment de la tourne. Au moment précis où les microbes commencent à se montrer, l'acidité volatile commence à augmenter; ensuite elle s'accroît proportionnellement à leur nombre. La coïncidence est aussi nette que possible. En général, dans un vin malade, l'acidité totale s'élève en même temps que l'acidité volatile; mais ici l'augmentation est masquée par les changements beaucoup plus importants qui résultent de la précipitation d'une partie de la crème de tartre sous l'influence de l'alcool et de l'abaissement de la température.....»

A cette époque il n'est donc pas encore question de bactéries comme agents de désacidification, cependant le diagnostic chimique s'améliore, puisque MOSLINGER (21) en 1901 constate que le taux d'acide lactique augmente quand l'acide malique diminue. Il propose l'équation suivante de dégradation de l'acide malique:



VENTRE (17) rappelle les 4 remarques de MOSLINGER:

- « a) Le moût de raisin frais ne contient pas d'acide lactique.
 b) Les moûts stérilisés, additionnés de levures pures, donnent des vins qui renferment de l'acide malique mais non de l'acide lactique.
 c) L'acide lactique n'apparaît que dans des vins faits avec des moûts non stériles et à mesure que l'acide malique disparaît. Le vin diminue d'acidité d'une quantité équivalente.
 d) L'acide lactique est un composé normal des vins. »

Sans retirer de valeur à cette étude, à la lumière de nos connaissances actuelles, on peut faire la critique suivante du (b): la fermentation alcoolique, même en l'absence de bactéries, apporte de l'acide

lactique, son taux va en croissant (CARLES , M.LAMAZOU-BETBEDER. 22); PEYNAUD (23) en trouve 4 à 9 méq /L dans toute fermentation normale. L'explication générale de MOSLINGER représente la première théorie chimique de la fermentation malolactique, elle sera complétée par les isolements de KOCH et SEIFERT (1901).

VENTRE (17) dans son traité cite le travail de KAYSER (24) rapportant dans son étude sur les fermentations lactiques, la découverte de KOCH (25) et SEYFERT (26). KAYSER écrit: « KOCH a isolé par la méthode des milieux gélatinisés diverses bacteries qui jouissent surtout de la propriété de décomposer l'acide malique. Elles se contentent comme aliment azoté, des matériaux fournis par la levure morte et résistent parfaitement à 8 % d'alcool. Ce savant a constaté des décompositions allant jusqu'à 60 % de l'acide malique restant et comme 40 % se retrouvent en solution, il admet que ce dernier acide est transformé en un autre acide qu'il n'a cependant pas recherché. SEYFERT vient de reprendre ces études et a isolé des bacteries analogues à celles de KOCH; il les a retirées de vins dans lesquels l'acidité avait beaucoup diminué, de vins francs de goût et reconnus vins de bonne qualité; ce qui nous permet de dire , 'à priori', que ces bacteries, loin d'être des ferments de maladie, doivent être plutôt considérées comme ferments utiles, ferments améliorants. Ces microbes poussent très bien sur les milieux habituels additionnés de peptone, d'acide malique; en l'absence d'air à 20 %, la culture se fait avec un abondant dégagement de gaz carbonique; ils sont sans action sur les acides succinique, tartrique, citrique, malonique. Ces microbes ne liquéfient pas la gélatine et se présentent sous forme de petites colonies d'aspect laiteux transparent de 1 M de diamètre; au microscope, on voit des formes légèrement elliptiques isolées ou en diplocoques. Le microbe est facultativement aérobie ou anaérobie... SEYFERT a constaté des diminutions d'acidité allant jusqu'à 44,2 %. Les acides formés aux dépens de l'acide malique sont, tout d'abord, l'acide lactique et, en moindre quantité, l'acide acétique et enfin l'acide carbonique. SEYFERT en raison de la formation de l'acide lactique , a donné au bacille, le nom de micrococcus malolacticus; il a constaté que la transformation s'arrête par suite de l'accumulation de l'acide lactique, antiseptique pour le microbe. C'est KOCH le premier qui a isolé des bactéries aptes à diminuer l'acidité des vins..... »

A ce moment on a des interprétations chimiques et microbiologiques du phénomène malolactique. Dans une région proche de la nôtre, MOREAU (27) en 1906, signale cette rétrogradation d'acidité dans les vins d'Anjou. (28). Il avait remarqué que grâce à la désacidification biologique,

les vins avaient une acidité totale assez comparable d'une année à l'autre. En effet, les années de bonne maturité, l'acide malique ne représente pas une part importante de l'acidité de titration, à l'inverse des années de faible maturité physiologique; mais dans ce dernier cas, les bactéries abaissent fortement la valeur malique. MOREAU fit des ensemencements de vins avec d'autres ayant subi la rétrogradation malolactique, les résultats furent concluants en ce sens que les vins ensemencés déclenchèrent plus rapidement que les vins bruts; mais l'auteur de ces essais fit bien remarquer que le déclenchement malolactique était capricieux et ne s'effectuait qu'à la longue.

Peu à peu, dans d'autres régions viticoles, on observe la transformation de l'acide malique; citons MANCEAU (29) en Champagne. MESTREZAT (30) avait une optique un peu différente des autres chercheurs, il dédiait aux levures le pouvoir de désacidification biologique des vins. C'est vers cette époque (1907), que figurent les études de LABORDE (31) qui étaient orientées sur plusieurs maladies biologiques des vins. Jusqu'en 1917 les conclusions de ce dernier auteur manquaient de bases sûres; RIBEREAU-GAYON et PEYNAUD (12) rapportent qu'il s'exprimait ainsi: « En somme, les résultats que j'ai indiqués permettraient peut-être d'envisager un certain nombre d'altérations du vin comme le fait d'un organisme unique dont les propriétés physiologiques se modifieraient sous l'influence des conditions variables d'un milieu aussi complexe et aussi changeant que le vin, en donnant des races plus ou moins fixées, qui détermineraient des altérations connues sous les noms de fermentation mannitique, tourne, pousse, amertume ». Certes, les caractères morphologiques des microorganismes varient suivant la constitution interne de différents milieux, mais un seul microbe n'est pas responsable de plusieurs maladies bactériennes !

En Alsace, c'est ROSENSTHIEL (32) qui publie des travaux sur la fermentation malolactique, il suit le dégagement de gaz carbonique dans ces vins. Ses essais portent sur des moûts; certains sont stérilisés, d'autres sont ensemencés avec des levures sélectionnées, d'autres sont tels; il les fait fermenter dans des récipients pleins, puis il les analyse au premier soutirage. Après, il observe qu'une fermentation se déclare avec un dégagement de gaz carbonique, sa remarque est la suivante: les caractères organoleptiques des vins d'Alsace sont diminués par cette seconde fermentation. Les éléments communs entre ces vins et les nôtres nous amènent à des conclusions identiques.

L'abaissement important d'acidité qu'il avait diagnostiqué, est appuyé par les chiffres suivants:

	acidité par litre. en Grammes d'acide tartrique.
Avant fermentation.....	9,54
Après fermentation alcoolique.....	8,31
Après fermentation malolactique.....	5,66

VENTRE (17) rappelle que AMTHOR (33) a analysé ces mêmes vins, préparés d'une façon différente, en partant des moûts de ROSENSTHIEL.

-A....vin témoin.

-B....vin d'expérience(moût stérilisé et ensemencé de levures pures.

	B vin témoin	A vin d'expérience
Acide malique.....	2,04.....	5,55
Acide lactique.....	1,64.....	0,76
Acide tartrique.....	1,33.....	1,89
Acide succinique.....	0,76.....	0,73

La baisse de la valeur de l'acide malique, correspond à l'augmentation de l'acide lactique.

Après cette revue des travaux Français, il nous faut mentionner les remarquables recherches Suisses de MULLER-THURGAU et OSTERWALDER(34)(35) et (36), qui amenèrent des précisions importantes sur les bactéries; malheureusement ces études furent publiées de 1912 à 1919 et sont restées presque inconnues en France par la Guerre 1914-18. La mise au point des auteurs suisses comprend trois mémoires de 300 pages au total. Les deux premiers publiés en 1912 et 1918 sont axés sur les bactéries qui ne décomposent pas l'acide tartrique (34)(35), et le troisième, 1919, étudie la décomposition de la glycérine et de l'acide tartrique(36). Une analyse détaillée des travaux de MULLER-THURGAU et OSTERWALDER a été faite par RIBEREAU-GAYON (37) en 1938, c'est à cette dernière que nous nous reportons. Les microbiologistes suisses ont isolés plusieurs bactéries du vin, ils en ont étudié les propriétés morphologiques et physiologiques; qui sont différentes. Ils utilisèrent des milieux de culture à base de jus de fruits peu acides ou d'eau de levures acidifiée et sucrée. Leur technique d'isolement fut celle de la

croissance sur plaques, ce qui leur donna des cultures très pures; les bactéries isolées se comportaient de la même façon dans des cultures successives, ce qui montre la valeur de cette méthode. Mais pour plus de sélection, les auteurs suisses repartaient d'une seule cellule pour l'élaboration d'une multiplication en plaque solide. Ce procédé d'isolement est simple, mais le vin est déjà un milieu sélectif et les liquides de cultures utilisés étaient acides eux-aussi, ce qui favorisait un triage. Au cours de leurs recherches, MULLER-THURGAU et OSTERWALDER ne trouvèrent pas de différence de prolifération dans des milieux menés en aérobie ou anaérobie. Ils conservaient leurs bactéries dans les mêmes conditions que pour l'isolement, que le support soit solide ou liquide; et à faible température. De leurs premiers travaux, jusqu'en 1919, ne résultèrent que des caractérisations de bactéries ne décomposant pas l'acide tartrique, ceci était dû au fait qu'ils n'utilisèrent que des milieux sucrés, dans lesquels la prolifération de toutes les espèces est possible, ils ne remarquèrent donc que les plus nombreuses, à développement rapide.

Bien avant la publication de leur premier rapport, ils avaient commencé à isoler des bactéries, de vins, de vins de fruits, ils en avaient observé les caractères et obtinrent 15 microorganismes en 3 groupes séparés, comprenant chacun 5 espèces assez voisines mais pouvant présenter des propriétés différentes. Evidemment, comme le fait remarquer RIBERAU-GAYON (37), on ne tenait pas compte à cette époque, des différences morphologiques et physiologiques résultant de la croissance sur plusieurs milieux.

Voici ces trois groupes.

-1°) Bactéries du premier groupe (Bacterium mannitolpoeum, f, k, p, q, t).

Relativement distinctes les unes des autres, ce sont des bactéries lactiques qui forment rapidement de la mannite en présence de lévulose. L'attaque des acides organiques se fait moins rapidement qu'avec d'autres bactéries.

Le type (t) seul a été tiré d'un vin de raisins blancs, les autres de fruits atteints de piqûre lactique. C'est aussi dans ce groupe que l'on doit ranger le "ferment mannitique" de GAYON et DUBOURG.

-2°) Bactéries du second groupe (Bacterium gracile, a, g, s, i, w). Dans cette deuxième classe la distinction est moins nette entre les types. Ce sont des bactéries lactiques, il y a formation de mannite avec le lévulose, mais moins fortement que dans le premier groupe. Dans la classe que nous étudions à ce second paragraphe, l'aspect morphologique est beaucoup plus frêle. Très grande

aptitude à décomposer l'acide malique et l'acide citrique.

Bacterium gracile, g, s, i, proviennent de vins; Bacterium gracile, g, en particulier provient d'un vin désacidifié avec une grande rapidité.

-3°) Le troisième groupe comprend des bactéries dont les formes ne sont pas les mêmes que celles des deux premiers. Ce ne sont plus des bâtonnets ou des fils, mais des microcoques de deux types différents: Micrococcus acidovorax et Micrococcus variococcus, pour ce dernier on a 4 sous-types: Micrococcus variococcus, h, m, n, l.

Tous ces microorganismes forment de l'acide lactique, mais ils ne sont pas producteurs de mannite à partir du lévulose. Ces 5 bactéries se rapprochent de celles du second groupe par leur grand pouvoir à décomposer l'acide malique. Micrococcus variococcus, h, m, proviennent de vins rouges. D'un vin filant a été isolé Micrococcus variococcus, n. D'un vin blanc atteint de piqure lactique a été tiré Micrococcus variococcus, l. Seul Micrococcus acidovorax provient d'un poiré.

Les microorganismes de ces 3 groupes, sont incapables de décomposer l'acide tartrique ou ses sels.

Dans les lignes suivantes, seront étudiés les caractères de ces bactéries dans un ordre différent de celui des auteurs suisses, comme l'a fait RIBEREAU-GAYON (37) pour avoir des comparaisons plus faciles.

A) MORPHOLOGIE.

A cette époque on tablait beaucoup sur les caractères morphologiques, sans tenir compte des différences qui peuvent exister pour un même individu cultivé dans des milieux ou des conditions dissemblables. Dans la fin de leurs travaux, en 1919, les chercheurs suisses reconnaissaient qu'il y a lieu d'être prudent pour le diagnostic des propriétés morphologiques d'une cellule.

Puisque les aspects microscopiques sont variables, il faut donc préciser le milieu où les observations ont été faites; les auteurs ont employé principalement un vin blanc désacidifié, additionné de 7 % de jus de raisin pour avoir une teneur en sucre de 17 g/l environ. Aucune des bactéries des 3 groupes n'est mobile, aucune ne forme de spores et ne liquefie la gélatine. Ces ferments lactiques sont tous gram-positif. MULLER-THURGAU et OSTERWALDER, en 1912 montrèrent, dans leur travail d'isolement, des " zoogléas " (amas de bactéries entrelacées, à surface lisse) et des bactéries dispersées ou rassemblées à la partie inférieure de bulles ou " ampoules " ('Blasen'), ces dernières quelquefois vides, éclatées ou de forme irrégulière.

Groupe du Bacterium mannitopoeum.

Dans le milieu indiqué plus haut (vin additionné de jus de raisin),
Bacterium mannitopoeum se présente comme suit:

Filaments longs ou courts, en général non divisés. Le type (k) est en fils plutôt courbes, ployés, et souvent divisés en courtes articulations.

- Pour les types (f) et (k) l'épaisseur des fils est de $0,6\mu$ à $0,8\mu$
pour le type (p) $1,00\mu$
pour le type (t) $1,15\mu$ à $1,30\mu$

Le type (t) qui est seul à provenir d'un vin de raisin, est plus gros que les autres. Les batonnets les plus courts ont une longueur de $1,50\mu$, quelquefois si ils sont moins longs, ils finissent par ressembler à des coques. En culture profonde dans la gélatine, Bacterium mannitopoeum est en forme de batonnets longs de $1,50\mu$, de $0,70\mu$ à $1,50\mu$ d'épaisseur, rarement en fils plus longs.

Groupe du Bacterium gracile.

Dans un milieu composé de vin blanc additionné de jus de raisin, ce microorganisme se présente en batonnet court; dans un poiré, son aspect microscopique devient en forme de fils plus ou moins longs, très sinueux, souvent cloisonnés. En milieu liquide comme solide, l'épaisseur des filaments est de $0,50\mu$, la longueur des batonnets les plus courts est de $0,75\mu$, ce qui les fait ressembler à des coques. Bacterium gracile à un aspect frêle, (d'où son nom); sa croissance est beaucoup plus faible que Bacterium mannitopoeum, en milieu solide comme en milieu liquide. Autant Bacterium mannitopoeum forme des dépôts abondants de plusieurs millimètres, autant Bacterium gracile croît lentement, recouvrant à peine le fond des flacons; il ne s'agglomère pas souvent en flocons, de toutes façons, dans l'affirmative, ses amas sont plus petits que ceux formés avec Bacterium mannitopoeum, la sédimentation est donc difficile pour Bacterium gracile, le liquide reste trouble longtemps, comme nous le verrons plus loin, c'est le cas le plus fréquent dans le Nantais où les vins rétrogradés restent très opalescents pendant plus d'un an.

Groupe des Micrococcus

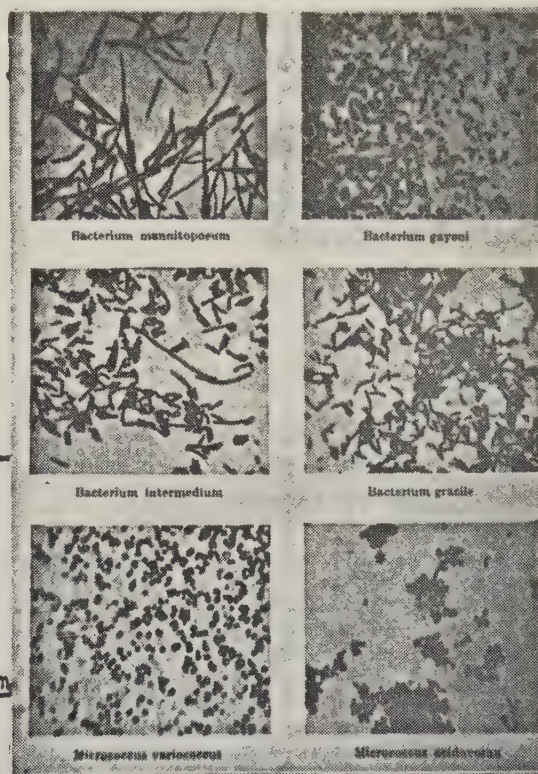
Dans le même milieu (vin blanc et 7% de jus de raisin), ces organismes ont la forme de coques isolées, rondes, de diplocoques, de tétrades; de

la même façon ils se présentent dans la gélatine.

Dans ces deux milieux, le diamètre est de $0,70\mu$ à $1,50\mu$ pour Micrococcus variococcus, et de $0,50\mu$ à $0,70\mu$ pour Micrococcus acidovorax. L'allure de croissance n'est jamais en flocons, mais on peut cependant trouver des zoogléas ou des ampoules. (très rarement chez Micrococcus variococcus).

Nous reproduisons Fig 1, la photographie de ces bactéries par MULLER-THURGAU et OSTERWALDER, au grossissement 1000, que ce dernier avait aimablement communiqué à RIBEREAU-GAYON.

Les 4 premières microphotographies représentent: Bacterium mannitolpoicum, Bacterium gayoni, Bacterium intermedium, et Bacterium gracile, cultivées dans un vin blanc additionné de jus de raisin; les deux dernières nous montrent Micrococcus variococcus et Micrococcus acidovorax, dans un milieu composé de vin blanc et de sucre.



Les bactéries de MULLER-THURGAU et OSTERWALDER.
(grossissement 1.000)

Fig. 1

(extraite du Traité d'Oenologie.
RIBEREAU-GAYON et PEYNAUD. 1961.
autorisation des auteurs.) (12)

B) PHYSIOLOGIE.

Pour pouvoir connaître, au cours d'une culture, les substances attaquées et les substances formées, il faut un milieu moins complexe que le vin ou les jus de fruits; c'est pourquoi les auteurs travaillèrent avec le milieu ci dessous:

Eau de conduite bouillie et filtrée.....	10 litres.
Peptone WITTE.....	10 grammes.
Phosphate dipotassique.....	1 gramme.
Sulfate de magnésium.....	0,2 g.
Chlorure de calcium.....	0,2 g.
Acide malique.....	1 gramme.
Lévulose.....	20 grammes.

mais le développement ne fût pas facile et ils ne purent tirer de résultats très certains, les productions d'acide lactique et acétique étant faibles. L'eau de levure, au contraire, leur fût plus favorable, et les substances qu'ils y ajoutèrent furent décomposées; ils ne tinrent pas compte de l'apport de ces dernières, par la levure, mais la valeur en est peu importante. La préparation du milieu était la suivante:

Eau.....10 litres
Levure pressée, fraîche et pure..... 1 Kg.
Acide malique.....10 grammes.

Stérilisation à 100°C, plusieurs fois, avec arrêt de quelques jours.
Repos 14 jours, filtration et répartition en flacons de 100 ml à 400 ml. Ensuite stérilisation, addition de la substance à essayer, ensemencement à la pipette avec quelques gouttes de culture. Fermeture par bouchon de liège stéril avec barboteur.
Incubation à 23°C. pendant 4 à 5 semaines, puis analyse chimique.
Avant de servir à l'ensemencement chaque type de bactérie était cultivé sur jus de poires très mûres à 23°C, ce qui donnait au bout de 14 jours un développement abondant.

Comme résultats des substances essayées, les auteurs suisses publièrent des dizaines de tableaux, RIBEREAU-GAYON (37) en a groupé quelques uns pour l'intérêt qu'ils présentent à l'oénologie.

Le premier tableau, montre les quantités produites d'acide acétique, d'acide lactique, d'alcool, de mannite; en partant de plusieurs éléments: dextrose, lévulose, acide malique, acide citrique. MULLER-THURGAU et OSTERWALDER ont déduit l'acide acétique et l'acide lactique formés dans l'eau de levure seule ensemencée par chacune des bactéries, dans le cas du dextrose et du lévulose; dans le cas de l'acide citrique et de l'acide malique les quantités formées étant très faibles (0,1 à 0,2 g) la correction fût négligeable. (l'eau de levure seule, utilisée pour ces calculs de corrections, était préparée sans acide malique).

Comme méthode de dosage de l'acide lactique, les auteurs utilisèrent celle de MOSLINGER au chlorure de baryum, pour la mannite ce fût celle de GAYON et DUBOURG, enfin les acides volatils furent dosés par entraînement à la vapeur d'eau .

RIBEREAU-GAYON partant des chiffres des microbiologistes suisses, a calculé en milliéquivalents la variation d'acidité.

Il a appelé:

(L).la variation d'acidité totale....au cours de l'attaque bactérienne.

(a).....d°..... de l'acide acétique.....d°.....

(l).....d°..... de l'acide lactique.....d°.....

(m).....d°..... de l'acide malique.....d°.....

TABLEAU DE MULLER-THURGAU et OSTERWALDER complété pour les trois dernières colonnes par RIBEREAU-GAYON. (Tableau II)									
ESSAIS A L'EAU DE LEVURE									
	Pactérie	Sucre disparu	Acide acétique formé	Acide lactique formé	Alcool formé	Mannite formée	Variation d'aci- dité libre	Acide acétique + acide lactique formés	Différence.
		en g/l.					en méq/l.		
Eau de levure + dex- trose 19,5 g/l. Ac.Tot = 11 méq. pH = 4,2 5 semaines à 23°C.	<u>B.mannit.f</u> <u>B.grac.a</u> <u>M.acidov.</u> <u>M.varioc.h</u>	19,5 12,2 7,8 2,4	2,4 1,7 0,1 0,0	4,6 3,0 4,2 1,6	3,8 1,4 0,0 0,1	0,0 0,0 0,0 0,0	+93 +59 +70 +13	+92 +62 +50 +18	+ 1 - 3 + 20 - 5
Eau de levure + lé- vulose 24,0 g/l. Ac.Tot = 11 méq. pH = 4,2 5 semaines à 23°C.	<u>B.mannit.f</u> <u>B.grac.a</u> <u>M.acidov.</u> <u>M.varioc.h</u>	23,0 21,7 5,4 1,5	3,1 2,8 0,1 0,1	2,7 3,1 4,8 0,5	0,0 0,0 0,0 0,1	6,7 6,3 0,0 0,0	+86 +83 +49 + 4	+82 +79 +55 + 8	+ 4 + 4 - 6 - 4
Eau de levure + aci- de malique 4,7 g/l Ac.Tot = 70 méq. pH = 3,3 5 semaines à 23°C.	<u>B.mannit.f</u> + <u>B.gracile.a</u> <u>M.acidov.</u> <u>M.varioc.h</u>		0,1 0,3 0,0 0,0	2,7 3,1 3,3 3,2			-35 -32 -26 -26	+32 +39 +38 +36	- 67 - 71 - 64 - 62
Eau de levure + aci- de citrique 2,45 g/l Ac.Tot = 38 méq. pH = 3,7 5 semaines à 23°C.	<u>B.mannit.f</u> <u>B.gracile.a</u> <u>M.acidov.</u> <u>M.varioc.h</u>		0,7 0,8 0,0 0,0	0,5 0,6 0,0 0,0			-18 -15	+18 +21	- 36 - 36
Eau de levure + aci- de citrique 5,25 g/l Ac.Tot = 82 méq. pH = 3,1 5 semaines à 23°C.	<u>B.mannit.f</u> <u>B.gracile.a</u>		0,1 1,5	0,0 0,8			- 7 -44	+ 2 +35	- 9 - 79
							L	a+1	L-(a+1)

RIBEREAU-GAYON a affecté L, a, l, m, du signe + ou - suivant qu'il y avait augmentation ou diminution d'acidité, à chaque augmentation de a, l, ou m, correspond une augmentation de même valeur de L.

L'égalité suivante nous donne:

$$L = a + l + m$$

$$m = L - (a + l)$$

On néglige les variations faibles d'ammoniaque, d'acide succinique, d'acide citrique, et on ne tient pas compte des précipitations de bitartrate de potasse. Dans les milieux renfermant de l'acide malique, l'égalité : $L - (a + l) = m$ nous donne m comme représentant la valeur de cet acide attaqué par les bactéries.

I°) Attaque des acides organiques.

Le tableau II indique que l'acide malique est décomposé par toutes les bactéries, Bacterium mannitolpoeum est plus lent que Bacterium gracile dans cette dégradation, cependant pour ces deux bactéries la destruction est presque complète, ceci est mis en évidence par les chiffres de la dernière colonne : 67 et 71 méq d'acide malique consommé pour un apport de 70 méq. L'attaque de ce dernier acide par les Micrococcus n'est pas aussi complète, 62 à 64 méq consommés, (vraisemblablement il y a formation d'un autre acide non déterminé). Les mêmes différences de comportement existent dans un autre essai fait avec une teneur en acide malique plus faible pour le milieu d'expérience. Les auteurs suisses ont fait aussi l'étude de ces bactéries dans des milieux neutres, le malate neutre de potassium, c'est à dire l'acide malique neutralisé, il est attaqué par les bactéries sauf Bacterium mannitolpoeum; mais ces tests ne sont d'aucun intérêt pour l'oenologie, les milieux étant trop voisins de la neutralité. D'autres essais menés avec Micrococcus acidovorax dans des milieux à l'extrait de levure, et renfermant du lévulose et de l'acide malique, ont montré que c'est ce dernier qui est dégradé et que le sucre sous cette forme lévulose, favorisait la croissance de ce microorganisme. L'acide citrique n'est pas du tout attaqué par les microcoques, dans les bactéries, c'est Bacterium gracile qui le décompose le plus fortement, ensuite Bactérium mannitolpoeum. Pour une acidité citrique de 2,45 g/l l'action des deux bactéries est complète, mais si on l'augmente à 5,25 g/l seul Bacterium gracile le dégrade. MULLER-THURGAU et OSTERWALDER ont fait des tests de décomposition de l'acide tartrique 2,32 g/l, de ses sels, tartrate acide de potassium 10,0 Gr/L et tartrate neutre de potassium 10,0 g/l, mais même après 8 mois, il n'y a pas de résultat. (les pH de ces trois milieux ont été calculé par RIBEREAU-GAYON et sont respectivement de : 3,4; 3,8; et 6,7).

2°) Attaque des sucres.

Le dextrose et le lévulose sont décomposés par toutes les bactéries, les microcoques sont moins puissants dans ce domaine, surtout Micrococcus variococcus; ils forment beaucoup moins d'acide acétique. Bacterium mannitopoeum et Bacterium gracile produisent un peu d'alcool en partant du dextrose, et de la mannite en partant du lévulose. La différence de comportement des bactéries et des microcoques est mise en évidence par le tableau suivant:

(Tableau III)

Les résultats sont exprimés en grammes par litre.

		Acide Acétique	Acide Lactique	Alcool	Mannite
100 g de Dextrose fournissent	avec <u>Bacterium Mannitopoeum</u> ou <u>Bacterium Gracile</u>	13	24	11-19	0
	avec <u>Micrococcus acidovorax</u>	0	54	0	0
100 g de Lévulose fournissent	avec <u>Bacterium Mannitopoeum</u> ou <u>Bacterium Gracile</u>	13	13	0	29
	avec <u>Micrococcus acidovorax</u>	0	89	0	0

L'action de Micrococcus variococcus est extrêmement faible.

Lorsque Bacterium mannitopoeum décompose le dextrose ou le lévulose, il y a production d'une substance "ayant l'odeur d'acétamide". Bacterium mannitopoeum attaque le saccharose, le maltose, le raffinose, le L-arabinose, à l'inverse de Bacterium gracile, c'est donc un critère pour la distinction de ces deux microorganismes.

C) FACTEURS AYANT UNE INFLUENCE SUR LES BACTERIES:ALCOOL,ACIDITE,TEMPE-
RATURE et OXYGENE.

L'alcool était ajouté à des doses variables après stérilisation, dans un milieu à base d'extrait de levure et additionné d'un peu d'acide tartrique(20 méq) et de 20 g /l de dextrose.

L'acidité était étudiée dans un milieu à l'extrait de levure, avec 10% de dextrose et des doses croissantes d'acide malique.

C'est Bacterium gracile qui supporte le mieux l'acidité,d'après RIBEREAU-GAYON, 15 g/l d'acide malique dans ce milieu,correspondent à un pH de 2,70, ce pH très acide montre le rôle important que joue Bacterium gracile dans la désacidification des vins.

La température était étudiée dans un milieu faiblement acide, (33 méq),à base de jus de poires.

(Tableau IV)

	<u>Bacterium Mannitopoeum</u>	<u>Bacterium Gracile</u>	<u>Micrococcus Acidovorax</u>	<u>Micrococcus Variococcus</u>
Alcool limite supérieur pour la croissance	voisin de 12 à 13	voisin de 9 à 10	voisin de 11 à 12	voisin de 10 à 11
Acide malique limite pour la croissance	voisin de 9,65 g par litre	voisin de 15 g par litre	au dessous de 9 g par litre	au dessous de 9 g par litre
Température optimale a)pour la vitesse d'acidification.	26 à 34,5°C	22 à 26°C	près de 26,5°C	près de 26,5°C
b)pour le degré d'acidification.	18,5à22,5°C	18,5à26,5 en °C	à 26,5°C	à 26,5°C
Besoin d'oxygène.	facultativement anaérobie.			

Le test de l'aérobiose et anaérobiose fut obtenu en plaçant des bouteilles, fermées par des bouchons d'ouate et recouvertes de papier, dans des cloches où l'air était remplacé par de l'hydrogène.(Dans la cloche se trouvait en plus un flacon contenant du pyrogallate pour éliminer les traces d'oxygène).Des bouteilles identiques,bouchées de la même façon,furent placées à coté de la cloche.Les conditions furent les suivantes: température 19°C. Milieu:extrait de levure,acidifié d'un peu d'acide tartrique et contenant 2% de dextrose.Durée 39 jours.

D) ETUDES SUR LES MOUTS ET LES VINS.

TABLEAU DE MULLER-THURGAU et OSTERWALDER complété pour les trois dernières colonnes par RIBEREAU-GAYON. (Tableau V)									
ESSAIS AU JUS DE RAISIN et AU VIN.									
	Bactérie	Sucre disparu	Acide acétique formé	Acide lactique formé	Mannite formée		Variation d'acide- libre	Acide acétique + acide lactique formés	Différence
		en g/l					en méq/L		
Jus de raisin légèrement désacidifié.									
Sucre =164 g/l	<u>B.mannit.f</u>	87,0	9,4	13,3	64,0		+272	+305	-33
Ac Totale 48 méq/L									
22 semaines à 16°C	<u>B.gracile.a</u>	41,0	3,6	8,9	21,0		+ 95	+159	-64
Vin rouge (<u>Clävner</u>) désacidifié et addi- tionné d'un peu de raisin.	<u>B.mannit.f</u>	10,1	1,7	3,6			+ 33	+ 68	-35
	<u>B.mannit.k</u>	10,1	2,0	4,6			+ 28	+ 84	-56
	<u>B.mannit.p</u>	9,8	1,5	4,6			+ 19	+ 76	-57
	<u>B.mannit.t</u>	10,2	2,3	5,2			+ 40	+ 96	-56
Acidité totale 44méq.	<u>B.gracile.a</u>	2,4	0,4	2,9			- 20	+ 39	-59
Ac.acétique 0,1 g/l	<u>B.gracile.g</u>	7,8	1,0	3,6			0	+ 57	-57
Ac.lactique 1,6 g/l	<u>B.gracile.s</u>	6,9	0,9	3,1			- 3	+ 49	-52
Sucre 10,5 g/l	<u>M.acidov.</u>	9,0	0,2	9,6			+ 66	+109	-43
Alcool. 8°4	<u>M.varioc.h</u>	0,6	0,1	1,2			- 20	+ 15	-35
8 semaines à 19°C.	<u>M.varioc.m</u>	0,0	0,1	0,7			- 11	+ 10	-21
	<u>M.varioc.n</u>	0,0	0,1	0,4			- 8	+ 6	-14
	<u>M.varioc.l</u>	0,3	0,1	0,2			- 8	+ 4	-12
Vin blanc (Chasselas) désacidifié et addi- tionné d'un peu de jus de raisin.	<u>B.mannit.f</u>	12,4	1,3	1,8			+ 38	+ 42	- 4
	<u>B.mannit.k</u>	10,4	1,1	2,0			+ 29	+ 40	-11
	<u>B.mannit.p</u>	8,2	0,8	1,5			+ 24	+ 30	- 6
	<u>B.mannit.t</u>	12,2	1,3	2,2			+ 49	+ 46	+ 3
Ac.totale= 31 méq	<u>B.gracile.a</u>	0,3	0,1	0,3			- 8	+ 5	-13
Ac.acétique 0,3 g/l	<u>B.gracile.g</u>	8,9	1,1	1,9			+ 22	+ 39	-17
Ac.lactique 1,1 g/l	<u>B.gracile.s</u>	0,1	0,	0,4			- 7	+ 4	-11
Sucre 17,5 g/l	<u>M.acidov.</u>	4,0	0,1	3,4			+ 31	+ 40	- 9
Alcool 11°3	<u>M.varioc.h</u>	0,1	0	0			- 5	0	- 5
8 semaines à 19°C	<u>M.varioc.n</u>	0,6	0	0			- 3	0	- 3
							L	a+1	L-(a+1)

-ETUDE SUR LES MOUTS

Les résultats de ces essais, consignés dans le tableau V, sont très comparables à ceux du tableau II. Bacterium gracile décompose mieux

l'acide que Bacterium mannitopoeum, et au contraire moins facilement le sucre. Avec des jus de fruits, Bacterium gracile, contrairement à Bacterium mannitopoeum, supporte de fortes acidités de l'ordre de 134 méq. Les Micrococcus ne peuvent croître que dans des milieux ayant une acidité faible et un indice de matières tannoïdes bas. Cette observation des chercheurs suisses sur les effets du tanin, est à notre connaissance une des plus ancienne dans ce domaine; comme nous le verrons plus loin dans notre recherche personnelle, les tannins ont une influence, mais c'est une propriété spécifique à certains de ceux-ci.

MULLER-THURGAU et OSTERWALDER étudièrent l'antagonisme levure-bactérie, mais les résultats ne furent pas constants. Ils remarquèrent que si des bactéries se développent dans un jus de fruit, (Bacterium mannitopoeum et Bacterium gracile) depuis quelques semaines; et que l'on y ajoute des levures, ces dernières sont tantôt freinées dans la fermentation alcoolique, tantôt insensibles à l'effet des bactéries. L'effet inhibiteur inverse, c'est à dire l'action des levures vis à vis des bactéries, est très variable; par exemple dans certains cas, la levure par son développement entrave celui des bactéries ou au contraire l'active. Dans un essai sur un jus de pommes et un jus de poires, les auteurs firent les ensemencements suivants: -levures, -Bacterium gracile, -levures + Bacterium gracile; ils remarquèrent après 7 à 8 semaines d'expérience à 19°C, que les bactéries ne gênent pas la levure et que cette dernière augmente la croissance et l'activité de Bacterium gracile.

-ETUDE SUR LES VINS.

Pour vaincre les difficultés de culture des microorganismes dans le vin (alcool et acidité élevés, manque d'aliment), les auteurs, après avoir désacidifié ce dernier, y ajoutaient un peu de jus de raisin (la désacidification se faisait au carbonate de calcium). Dans cette étude sur le vin, ils ont confirmé la résistance de Bacterium gracile à l'acidité, citons leur expérience avec un cidre dont les caractéristiques étaient les suivantes: Ac. 179 méq, Alcool. 5°3, ensemencé et conservé à 19°C; l'observation 3 semaines après fournissait les chiffres qui suivent: Acide lactique passé de 0,7 à 7,7 en g/l; acide acétique de 0,35 à 0,43 g/l; par contre sucre inchangé 3,2 g/l. Mais dans les vins et les vins de fruits ayant subi une désacidification chimique, il y avait attaque du sucre en plus de l'acide malique.

Le tableau V met en évidence la facilité pour Bacterium mannitopoeum à décomposer les sucres et la difficulté pour Micrococcus variococcus. On peut remarquer aussi que les Microcoques ne forment que très faiblement de

l'acide acétique. De leurs expériences avec des vins, on ne peut conclure que la présence de levure accélère ou ralentisse le développement des bactéries ce qui est en contradiction avec les travaux de KOCH (25) et SEYFERT (26).

Dans l'énumération des " maladies du vin ", MULLER-THURGAU et OSTERWALDER ne citent pas la " diminution d'acidité ", car vraisemblablement ils la considèrent comme un affinement du vin, mais cependant comme le rapporte RIBEREAU-GAYON (37) ils notaient à l'époque: « dans les vins déjà peu acides, elle peut être défavorable; elle peut communiquer au vin un trouble, une couleur brune, une saveur fade et même elle peut avoir pour conséquence secondaire une véritable maladie, la tourne ou la piqure lactique, qui étaient primitivement empêchées par l'acidité. »

Sur cette diminution d'acidité, les auteurs suisses observèrent qu'un moût de raisin que l'on abandonne à la fermentation, perd une part importante de son acidité initiale, soit pendant, aussitôt après ou longtemps après la fermentation. Dans deux essais où l'acidité au départ était de 180 méq et 108 méq, elle s'est abaissée à 118 méq et 56 méq, il y avait en même temps formation de 2 à 3 g d'acide lactique, et un examen microscopique montrait une prolifération de bactéries. (si dans certains cas il y a formation d'acide lactique sans diminution d'acidité, c'est au détriment du sucre). Dans un vin acide ou d'acidité normale, la diminution est provoquée par Bacterium gracile; dans un vin peu acide, ce sont les microcoques qui en sont les agents. Plusieurs facteurs agissent sur la perte d'acidité.

Le soutirage (même sans SO₂) empêche ou retarde cette action; mais si cette diminution est commencée, il n'a aucun effet.

Le tanin est inhibiteur, pour étudier ce problème, les auteurs abaissèrent le taux de matières tanniques des moûts en les traitant à la poudre de peau.

L'acidité élevée peut empêcher ou retarder.

La température a une influence très nette; au cours de leurs essais MULLER-THURGAU et OSTERWALDER remarquèrent que des vins restent quelquefois non rétrogradés pendant 1 an à la température de 9°C, mais par contre évoluent rapidement à 16°C, nous verrons par ailleurs, dans notre étude personnelle l'influence de ce facteur.

L'anhydride sulfureux joue le rôle de ralentisseur, RIBEREAU-GAYON relate que les microbiologistes suisses incorporèrent 225 mg. /l de métabisulfite laissant 111 mg. /l d'acide sulfureux total, dans un jus de pommes, et ne notèrent pas de blocage de la fermentation malolactique mais simplement un retard de six mois environ.

Pour les possibilités d'ensemencements, aucun résultat ne fut obtenu, même avec l'addition de 1 litre de culture pure de Bacterium gracile pour 600 l de cidre. Comme remède préventif de la désacidification biologique ils conseillent l'addition d'acide tartrique, qui doit gêner le développement des bactéries, par changement brutal de pH, l'acide citrique n'est pas utilisable ici, il serait décomposé.

L'addition de levures même en grande quantité, n'entrave pas la prolifération des bactéries de la " diminution d'acidité "; mais dans le cas de la " piqure lactique ", l'addition de levures pures renforce la protection déjà obtenue par acidification à l'acide tartrique. Un moût de poires Ac = 48 méq, fut additionné de 0,1, 2, 3 g /l d'acide tartrique et ensuite abandonné à la fermentation spontanée par les levures indigènes d'une part, et par les levures indigènes + levures pures d'autre part; après quelques mois d'essais, les chiffres d'acidité volatile en g/l sont les suivants:

(Tableau VI)

Moût de poires	Levures indigènes	Levures indigènes + Levures pures.
	Ac.vol en g/l	Ac.vol en g/l
Sans addition d'acide	3,3	2,2
Avec 1 g/l d'acide tartrique	2,6	1,2
Avec 2 d°	1,8	0,9
Avec 3 d°	1,6	0,7

INFLUENCE DES LEVURES PURES SUR LA PIQURE LACTIQUE.

D'après MULLER-THURGAU et OSTERWALDER rapporté par RIBEREAU-BAYON

Le tableau VI met en relief l'influence de l'acidité et celle des levures pures. Dans leurs travaux sur la piqure lactique, qui sortent du cadre de notre étude, les auteurs indiquent qu'ils ont ajouté, dans certains cas, à un jus de poires (Ac=69 méq.essai à 17°C) 450 mg /l de métabisulfite de potassium, mais que cette dose, (qui serait impensable dans notre région Nantaise) n'a fait que retarder la fermentation malolactique sans l'arrêter.

En 1918, la classification s'enrichit de nouvelles races. MULLER-THURGAU et OSTERWALDER isolèrent de vins rouges suisses, peu après la fermentation alcoolique, trois bactéries dont les propriétés physiologiques se rapprochent de Bacterium mannitolpoeum; celles-ci forment moins d'acide acétique à partir du dextrose et du galactose, mais elles ont une action beaucoup plus puissante sur la décomposition de l'acide malique et du malate acide de calcium, elles attaquent aussi l'acide citrique. Cette nouvelle espèce de bactéries, ayant un comportement tantôt analogue à Bacterium manni-

topoeum, tantôt à Bacterium gracile, reçut des microbiologistes suisses la désignation de Bacterium intermédiaire. Ils ajoutèrent à tous ces microorganismes qu'ils avaient isolés, le ferment mannitique que GAYON et DUBOURG avaient mis à leur disposition en 1911, en lui donnant le nom de Bacterium Gayoni.

Pour ces dernières bactéries les mêmes techniques que précédemment furent utilisées, et de leurs expériences sur les solutions nutritives on peut tirer les conclusions qui suivent. Pour Bacterium mannitopoeum et Bacterium gayoni le comportement est semblable sur le dextrose, formation presque égale dans les deux cas d'acide acétique et d'acide lactique, Bacterium intermedium forme huit à dix fois moins d'acide acétique à valeur égale d'acide lactique formé. Sur le lévulose le mode d'action de ces trois derniers microorganismes est identique. Les acides organiques furent testés dans un milieu à l'eau de levure, et pour une addition de 6,20 g/l d'acide malique aucune attaque ne fut remarquée, par contre pour une teneur de 2 et 4 g/l les résultats classés en ordre croissant furent ceux ci :

Bacterium gayoni.....attaque nulle ou très faible.

Bacterium mannitopoeum.....attaque faible 15 %.

Bacterium intermédiaire.....attaque forte..60 %.

ce dernier microbe est le plus apte à la dégradation de l'acide malique, il se rapproche en cela de Bacterium gracile et des microcoques. L'acide tartrique et l'acide succinique ne sont même pas attaqués au bout de 8 mois. L'acide citrique facilement décomposable, ne l'est pas par Bacterium intermedium et Bacterium gayoni.

Sur le jus de raisin c'est Bacterium mannitopoeum qui en transformant le sucre forme le plus d'acide acétique, à l'inverse de Bacterium intermedium. Voici les résultats d'un test de MULLER-THURGAU et OSTERWALDER sur un moût de raisin stérilisé et désacidifié (29 méq) contenant 128 Gr/L de glucose.

Tableau de MULLER-THURGAU et OSTERWALDER par RIBEREAU GAYON. (Tableau VII)							
	Sucre disparu	Ac acét. formé.	Ac lact. formé	Mann formée	Var d'ac libre	Ac acét. Ac lact	Diff.
	en grammes par litre				en milliéquivalents		
<u>Bacterium mannitopoeum</u>	69	9,0	12,9	39	+ 208	+ 293	-85
<u>Bacterium gayoni</u>	44	5,1	8,7	23	+ 133	+ 182	-49
<u>Bacterium intermedium</u>	60	7,7	12,6	42	+ 171	+ 268	-97
<u>Bacterium gracile</u>		0,7	3,1		- 5	+ 46	-51
<u>Micr.acidovorax</u>		0,3	3,3		0	+ 42	-42
<u>Micr.variocooccus</u>		0,0	3,0		- 25	+ 33	-58

Sur 5 vins rouges secs (sans sucre) de 1915 les chercheurs firent le protocole d'essai suivant; ces vins qui n'étaient pas désacidifiés ni spontanément ni artificiellement furent ensemencés avec Bacterium mannitolopoeum, Bacterium intermedium, et Bacterium gayoni. (Ac = 90 à 134 méq). Seul Bacterium intermedium a attaqué l'acidité en formant 2 à 3 méq d'acide acétique, les deux autres bacteries restèrent sans action; mais toutes conditions égales, si on ensemence avec Bacterium gracile l'attaque des acides s'effectue toujours avec formation de beaucoup plus d'acide acétique (6 à 8 méq); le même vin, brut, non stérilisé, ensemencé ou non se comporte toujours après les essais comme dans le dernier cas avec Bacterium gracile. L'augmentation d'acidité volatile avec ce dernier microorganisme est due vraisemblablement, comme le fait remarquer RIBEREAU-GAYON (37), à une décomposition de l'acide citrique. Au microscope, le développement en premier lieu de Bacterium gracile est suivi de ceux de Bacterium mannitolopoeum et Bacterium gayoni. En conclusion pratique, on peut admettre que Bacterium mannitolopoeum est incapable de décomposer l'acide malique (tout au moins dans les conditions où il se trouve dans un vin); Bacterium intermedium et Bacterium gracile sont avec les microcoques les meilleurs agents de cette dégradation surtout Bacterium gracile.

Les caractères morphologiques de ces trois microorganismes, sans grande différenciation, sont des fils plus ou moins sinueux, des batonnets courts ou longs, dans les vins nous trouvons ces dimensions:

Longueur des batonnets.....	1,0 μ	1,2 μ	1,5 μ
Epaisseur.....	0,8-1,0 μ	0,8-0,9 μ	1,0 μ
	Bacterium gayoni	Bacterium intermedium	Bacterium mannitolopoeum

Dans les jus de fruits le développement fournit des dimensions plus importantes, 1,3 à 1,7 μ pour la longueur, et 1,0 à 1,3 μ pour l'épaisseur. Dans les milieux de culture simples et sucrés Bacterium intermedium et Bacterium mannitolopoeum forment des dépôts importants et floconneux de fils entrelacés. Ces bacteries sont immobiles et ne forment pas de spores.

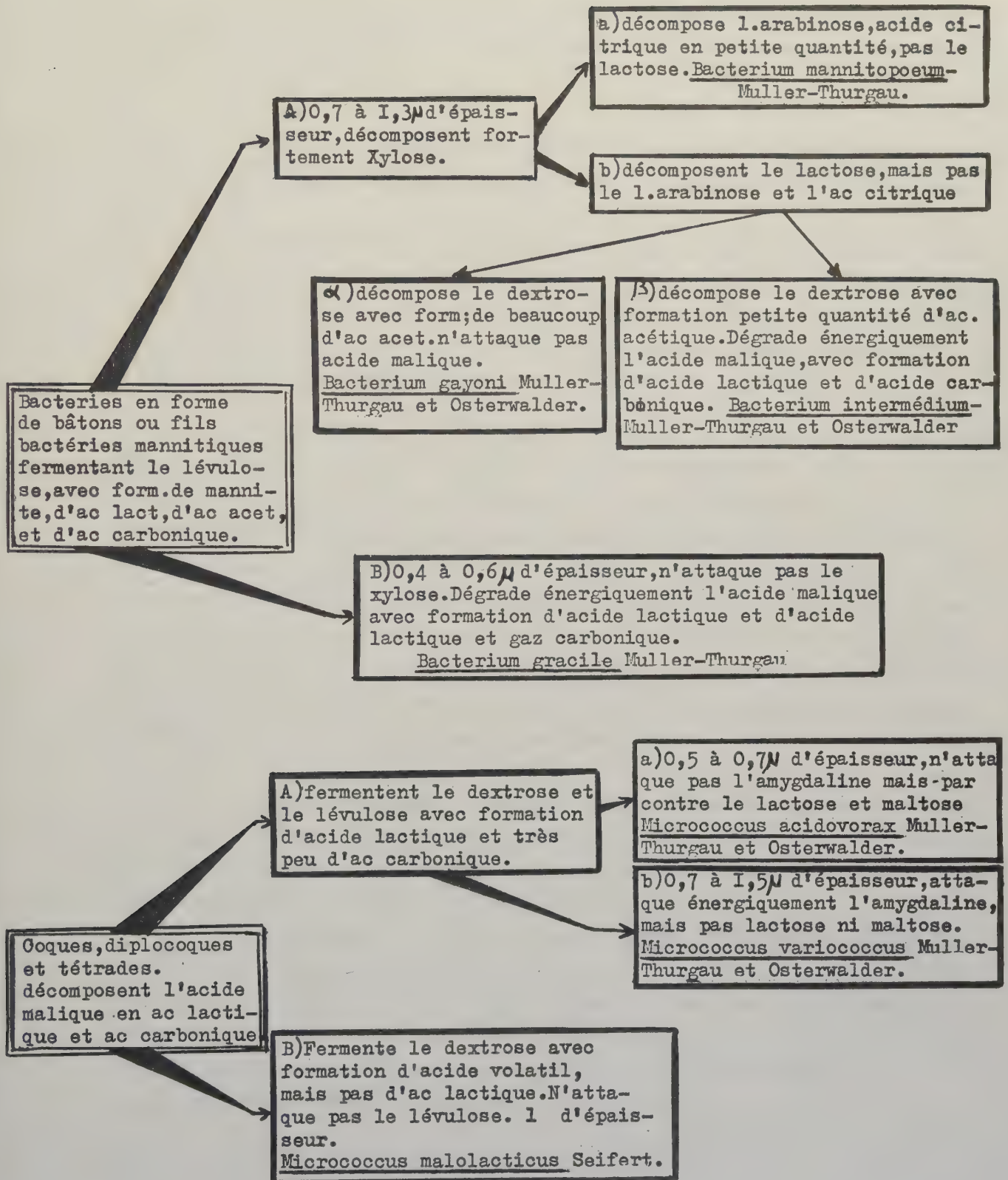
Les auteurs indiquent que la simple étude microscopique des caractères morphologiques n'est pas suffisante et ils conseillent de procéder à un criblage par les propriétés physiologiques comme dans le tableau VIII

Tableau des propriétés physiologiques de MULLER-THURGAU et OSTERWALDER

(Tableau VIII)

	<u>Bacterium</u> <u>mannito-</u> <u>poeum.</u>	<u>Bacterium</u> <u>gayoni.</u>	<u>Bacterium</u> <u>interme-</u> <u>dium.</u>	<u>Bacterium</u> <u>gracile.</u>	<u>Micr.aci-</u> <u>dovorax.</u>	<u>Micr.vario-</u> <u>coccus.</u>
Dextrose.....:	5	5	4	: 5	: 5	: 3
Lévulose.....	5	5	5	5	5	3
Galactose.....	5	4	4	2	5	3
Saccharose.....	5	3	4	0	?	?
Lactose.....	0	2	2	0	3	0
Maltose.....	5	5	5	0	5	?
Raffinose.....	4	4	4	0	0	0
l.Arabinose.....	5	0	0	0	0	0
Xylose.....	5	5	4	0	0	0
Rhamnose(isodulci- te)	0	0	0	0	0	0
α méthylglucoside	5	4	3	4	0	2
Amygdaline.....	3	0	?	I	0	5
Glycérine.....	0	0	0	0		
Mannite.....	0	0	0	?	?	?
Ac.malique.....	I	0	4	5	5	5
Malate neutre de potassium.....	I	0	3	3	5	3
Malate acide d'ammonium.....	I	0	I	2	2	2
Malate acide de calcium.....	3	0	5	5	5	5
Malate d'éthyle..	I	0	2	3	3	3
Acide lactique...	0	0	0	0	0	0
Acide citrique...	2	0	0	4	0	0
Acide tartrique et ses sels.....	0	0	0	0	0	0
Acide succinique.	0	0	0	0	0	0

Pour conclure, MULLER-THURGAU et OSTERWALDER exposent un tableau de classification physiologique des bacteries, il faut y ajouter Bacterium tartarophthorum Muller-Thurgau et Osterwalder qui seul décompose l'acide tartrique.



Dans ce tableau récapitulatif (IX), nous avons indiqué d'une façon plus marquante, les bactéries intéressant la fermentation malolactique.

Avec les travaux de MULLER-THURGAU et OSTERWALDER que nous venons de voir, commence une époque où ce phénomène fut étudié d'une manière plus approfondie.

LABORDE (38) en 1917, remarquait que l'acide lactique est souvent présent dans les vins de Bordeaux normaux, et il observait dans un de ces derniers la décomposition de l'acide malique par les bactéries; ce qui leur donnait une amélioration gustative. LABORDE titrait les acides organiques au cours de ses essais, avec des méthodes personnelles de dosage.

En Bourgogne, vers 1920-1921 FERRE fit la remarque de cette dégradation de l'acide malique (7), ses recherches s'étendirent jusqu'en 1928(40), et il constata que la "fermentation malolactique" représentait une phase importante dans le vieillissement des vins fins de Bourgogne, qu'elle était beaucoup plus fréquente qu'on ne le suppose et que tout vin contenant de l'acide malique doit tôt ou tard la subir. Il nota une relation entre la casse ferrique et la rétrogradation malolactique, en attribuant le déclenchement de cette casse au rôle solubilisant de l'acide malique sur les composés ferriques; mais en plus de ce rôle, à notre avis, il y a une répercussion de la variation du pH sur l'équilibre du fer dans le vin.

Dans le Bordelais RIBEREAU-GAYON et PEYNAUD, à partir de 1935 étudièrent cette modification de l'acidité des vins (41). Dans leur note à l'Académie d'Agriculture, ils firent remarquer que cette désacidification est souhaitable pour le bouquet des vins de cette région.

Ils communiquent dans ce même rapport leurs dosages d'acidité totale, acidité volatile, pH, sucres, acides organiques effectués sur des vins de 1936 et 1937 avant et après fermentation malolactique. Nous reprenons leurs chiffres dans le tableau (X), les résultats sont exprimés en méq/L; RIBEREAU-GAYON et PEYNAUD soulignent qu'il ne faut pas considérer le vin comme résultant d'une fermentation alcoolique pure.

(Tableau X) d'après RIBEREAU-GAYON et PEYNAUD

	Glycé- rine	Sucre	pH	Ac: totale	Ad. vol.	Ac tar- trique	Ac mali- que.	Ac ci- trique	Ac lao- tique.	Som- me des varia- tions
	m.mol.	g.		en milliéquivalents						
1937.Côtes pasteurisé non-past.		2,0 1,7	3,38 3,47	98 79	8,1 13,1	44,2 39,7	36,8 0	5,4 0,9	3,8 24,5	
<u>Variations</u>				<u>-19</u>	+5,0	-2,2 (2)	-36,8	-4,5	+20,7	<u>-17,8</u>
1936.Côtes pasteurisé non-past.	67 68	2,6 1,9	3,15 3,23	110 84	3,7 6,2	47,4 41,3	40,8 0	5,1 1,0	4,3 25,2	
<u>Variations</u>				<u>-26</u>	+2,5	-3,0 (2)	-40,8	-4,1	+20,9	<u>-24,5</u>
1936.Palus pasteurisé non-past.	86 83	2,5 2,1		152 103	6,9 12,5		98,0 9,6	6,8 0,8	7,0 43,4	

(2) La diminution a été provoquée par une précipitation de bitartrate dans le vin (précipitation plus grande dans le non pasteurisé) la diminution correspondante de l'acidité n'est que la moitié de celle de l'acide tartrique précipité.

A peu près à la même époque, soit 1936, ARENA (42) isola de vins Argentins, 22 bactéries groupées en 8 espèces, cinq de ces dernières peuvent être classées comme nouvelles. Les recherches de cet auteur furent menées dans l'esprit de MULLER-THURGAU et OSTERWALDER, les milieux employés pour l'isolement furent ceux au moût de malt ou de céréales, solidifiés à l'agar, avec repiquage des colonies au micromanipulateur; pour les tests physiologiques, il utilisa l'eau de levure acidifiée par 1 g d'acide malique. Dans les travaux de cet auteur Argentin, RIBEREAU-GAYON indique que l'on trouve brièvement cités les chercheurs Italiens qui se sont préoccupés de ce problème: GAIEAZZI (1895), SOSTEGNI et PRANDI (1903), PARIS (1907), PAVARI (1911), MENSIO et GARINO-CANINA (1914), DE ASTIS (1924).

Nous reproduisons un tableau des caractères physiologiques des bactéries isolées par ARENA, que nous empruntons au Bulletin de l'Association des Chimistes sous la signature de RIBEREAU-GAYON (37).

Pouvoir fermentatif des bacteries isolées par ARENA.

(Tableau XI)

	Bact. gayoni	Bact. inter- dium.	Bact. cocci- forme.	Bact. muller- thurgau	Bact. acido- vorax.	Micr. vario- coccus.	Micr. multi- vorax.	Bact. recti- forme.
Glucose.....	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++
Lévuiose....	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Galactose...	+++	+++	+	+++	+++	-	++	+++
Lactose.....	+++	+++	++	-	-	-	++	+++
Maltose.....	+++	+++	++	+++	+++	-(+)	+	+++
Saccharose..	++	+++	+	+++	+++	-	-(+)	+++
Raffinose...	+	+	+	+	-(+)	-	-(+)	-(+)
Xylose.....	+++	+++	++	++	-(+)	-	-	-(+)
Arabinose...	-	-	+++	+++	-	-	-	-
Glycérine...	-	-	-	-	+	-	-	+
Mannite.....	-	-	-	-	++	-	-	++
Amygdaline..	-	-	-	-	++	++	+++	+++
Dextrine....	-	-	-	-	-	-	-	-(+)
Ac malique..	-	+	++	+	++	+++	+++	+
Ac tartrique	-	-	-	-	+++	-	-	-
Ac citrique.	-	-	++	-	+++	-	-	-

Les parenthèses se rapportent au cas où il a pu y avoir fermentation.

Après ce point de vue étranger, revenons à la France, où l'Ecole de Bordeaux continue ses travaux. Dans un extrait des Procès-verbaux de la Société des Sciences Physiques de Bordeaux, RIBERAU-GAYON (43) publie en 1937 une étude particulièrement axée sur les bacteries lactiques et sur l'influence du pH dans leur développement. Les essais réalisés avec des microorganismes isolés par la technique des dilutions fournissent deux groupes, suivant qu'ils décomposent ou non l'acide tartrique, dans l'affirmative l'auteur les nomme "bactéries type tourne", dans l'autre cas "bactéries type malolactique". Il effectue une première série de tests avec un milieu à l'eau de levure additionné d'acide malique ou d'acide tartrique et dans lequel on incorpore plus

ou moins de soude pour obtenir des pH différents ,et une seconde sur un vin rouge nouveau d'une acidité totale de 130 méq,de pH 3,3 et amené à 5 pH variés de 3,10, 3,3, 3,5, 3,75 et 3,95.

a)milieu à l'eau de levure.

-1)effets des bacteries

type"malolactique" sur

- ce milieu.....-dégradation d'acide malique dès pH 3,2 avec peu d'acide acétique formé.
-aucune attaque de l'acide tartrique même à pH élevé.
-action sur le glucose et le lévulose à partir de pH 3,3-3,6.

-2)effets des bacteries

type"tourne" sur

- ce milieu.....-attaque de l'acide malique dès pH 3,2 avec formation d'acide acétique.
-dégradation de l'acide tartrique dès pH 3,5 avec grosse formation d'acide acétique.
-décomposition énergétique du glucose dès pH 3,2 avec quantité importante d'acide acétique.
-décomposition du lévulose vers pH 3,5 env.

b)milieu: vin rouge nouveau.

-1)effets des bactéries

type "malolactique" sur

- ce milieu.....-abaissement de l'acidité dès pH 3,3 ou même 3,1
-aucune attaque de l'acide tartrique .
-aspect....coques à pH élevé
batonnets à pH bas
-troublent le vin à tous les pH.

-2)effets des bacteries

type " tourne " sur

- ce milieu.....-aucune désacidification biologique à pH 3,3
-désacidification biologique à pH 3,5 ou 3,75
-acide tartrique attaqué à partir de ces pH avec formation de beaucoup d'ac.volatile.
-aspect morphologique...filaments longs et sinueux.

ces bacteries des deux types, sont facultativement aérobies ou anaérobies,

l'influence nette de la concentration en ions H⁺ est mise en relief ici, avec le triage des bacteries par leur action positive ou négative sur l'acide tartrique.

Des caractères analytiques complets, nous sont donnés par l'Ecole Bordelaise, où RIBEREAU-GAYON en collaboration avec PEYNAUD publie un " bilan de la fermentation malolactique " (44) ; nous reproduisons ci dessous, un de leurs tableaux.

TABLEAU DE RIBEREAU-GAYON et PEYNAUD (Tableau XII)

Types	Sucres red.	Glycé- rol.	pH	Acidi- té tot tale.	Acide tartri- que.	Acide mali- que.	Acide citri- que.	Acides vola- tils.	Acide lacti- que.	Somme des va- riations
	g/l			résultats	en milliéquivalents					
N°1 past.	2,6	67	3,15	110	47,4	40,8	5,1	3,7	4,3	
non past.	1,9	68	3,23	84	41,3	0,0	1,0	6,2	25,2	
Variation				<u>-26</u>	-3,0	-40,8	-4,1	+2,5	+20,9	<u>-24,5</u>
N°2 past.	4,7	61	3,24	94	35,0	49,6	4,8	3,1	4,3	
non past.	1,6	63	3,40	72	31,2	2,6	1,0	8,4	27,0	
Variation				<u>-22</u>	-1,9	-47,0	-3,8	+5,3	+22,7	<u>-22,7</u>
N°3 past.	1,8	75		84	32,3	39,6	4,9	3,1	7,5	
non past.	1,5	75		70	32,5	2,8	0,8	10,0	27,1	
Variation				<u>-14</u>	0,0	-36,8	-4,1	+6,9	+19,6	<u>-14,4</u>
N°4 past.	2,6	80	3,21	106	32,8	48,0	6,7	6,2	4,7	
non past.	1,8	81	3,33	82	28,9	2,0	1,1	10,0	29,7	
Variation				<u>-24</u>	-1,9	-46,0	-5,6	+3,8	+25,0	<u>-24,7</u>
N°5 past.	1,2		3,17	110	52,1	50,4	4,6	4,1	5,9	
non past.	1,0		3,24	83	46,0	0,0	0,6	9,4	33,0	
Variation				<u>-27</u>	-3,0	-50,4	-4,0	+5,3	+27,1	<u>-25,0</u>
N°6 past.	1,5		3,21	102	42,5	44,0	4,2	3,7	3,6	
non past.	1,3		3,33	80	38,0	0,0	1,0	6,2	28,4	
Variation				<u>-22</u>	-2,2	-44,0	-3,2	+2,5	+24,8	<u>-22,1</u>
N°7 past.	1,2			129	51,5	68,8	2,9	3,7	3,8	
non past.	1,0			93	43,4	0,0	0,9	6,9	39,3	
Variation				<u>-36</u>	-4,0	-68,8	-2,0	+3,2	+35,5	<u>-36,1</u>
N°8 past.	1,6			109	37,6	53,6	5,9	4,1	4,4	
non past.	1,1			84	33,7	2,6	1,4	9,4	31,8	
Variation				<u>-25</u>	-1,9	-51,0	-4,5	+5,3	+27,4	<u>-24,7</u>
N°9 past.	2,0	93	3,01	108	39,1	50,5	5,4	6,2	6,5	
non past.	2,0	93	3,10	78	34,8	4,4	2,7	7,5	27,9	
Variation				<u>-30</u>	-2,1	-46,1	-2,7	+1,3	+21,4	<u>-28,2</u>
N°9bis pas.	2,0	93	3,44	87	36,9	48,5	5,4	6,2	6,0	
non past.	2,0	92	3,56	60	32,5	1,2	1,0	10,0	30,0	
Variation				<u>-27</u>	-2,2	-47,3	-4,4	+3,8	+24,0	<u>-27,1</u>
N°10 past.	4,2	93	3,15	115	34,8	59,0	6,9	8,1	6,0	
non past.	2,1	92	3,26	81	27,4	5,2	4,3	10,0	31,5	
Variation				<u>-34</u>	-3,7	-53,8	-2,6	+1,9	+25,5	<u>-32,7</u>
N°10bis pas.	4,2	91	3,49	96	36,0	56,5	6,9	8,1	5,7	
non past.	2,0	92	3,68	65	32,0	0,0	1,9	12,5	32,6	
Variation				<u>-31</u>	-2,0	-56,5	-5,0	+4,4	+26,9	<u>-32,2</u>
N°11 past.	2,4	84		142		84,6	6,1	6,9	6,8	
non past.	1,8	84		113		33,6	6,1	7,5	25,6	
Variation				<u>-29</u>		-51,0	0,0	+0,6	+18,8	<u>-31,6</u>
N°12 past.	1,9	80	3,45	109	28,3	75,1	5,8	6,2	7,5	
non past.	1,4	80	3,67	72	28,1	5,0	0,9	10,6	40,4	
Variation				<u>-37</u>	0,0	-70,1	-4,9	+4,4	+32,9	<u>-37,7</u>

les échantillons 9 bis et 10 bis, furent additionnés de 20 ml de NaOH/N par litre.

De leurs essais, les auteurs concluent: « la désacidification a été générale et par conséquent la présence de bactéries dans le vin, l'acidité de titration a diminué de 15 à 30 méq par litre, soit de 0,75 à 1,5 g environ exprimé en SO_4H_2 . Le pH a augmenté en moyenne de 0,1. En milliéquivalents, l'acide lactique formé correspond de manière satisfaisante à la moitié de l'acide malique fermenté. ». Nous remarquons que l'acide malique est en général décomposé jusqu'à sa disparition, par contre l'acide citrique est attaqué moins à fond. A cette époque, les chercheurs Bordelais n'avaient pas noté de variation sensible du cation NH_4 ; le glycérol n'a pas été touché, la fermentation de ce polyalcool et celle de l'acide tartrique, sont spécifiques aux bactéries de la tourne.

En 1939, RIBEREAU-GAYON (45) précise que si à 36 ou 37°C les arrêts de fermentation alcoolique, ont pour résultat une prolifération bactérienne, cela ne veut pas dire que ces bactéries se développent mieux à cette température, mais que la fermentation à ce stade est paralysée et leur laisse le champ plus libre; observation de l'antagonisme levure-bactérie.

Un état des connaissances de l'époque sur l'action des bactéries dans le vin, est publié en 1941 par RIBEREAU-GAYON (11), il partage ces microbes en deux groupes selon qu'ils attaquent ou non l'acide tartrique, sans tenir compte de l'acidité; il souligne que la plupart des bactéries du vin sont capables de dégrader l'acide malique; mais la décomposition de l'acide tartrique et du glycérol est un caractère propre à certains microorganismes. La notion de pH intervient comme facteur de déclenchement, ce sont les bactéries lactiques qui sont le plus résistantes à l'acidité réelle (pH 3,0 limite), l'attaque de l'acide tartrique ne s'effectue qu'à des pH de l'ordre de 3,5, éventuellement 3,25, la décomposition des sucres est possible à des pH intermédiaires; sa conclusion ? Un triage des bactéries basé sur le pH.

Le même auteur en 1942 par les "Annales des fermentations" (46) nous donne une synthèse des travaux antérieurs, jusque là épars, manquant de cohésion et de clarté, et de ce fait difficilement utilisables. De 21 dépôts différents abandonnés au laboratoire et examinés un an après (Janvier 1937), RIBEREAU-GAYON tire un grand nombre de microorganismes par la technique de la séparation en milieu solide avec repiquage sur 4 milieux de culture par souche et trois dilutions pour chacune des souches. Ces milieux furent les suivants: a) un vin nouveau renfermant de l'acide malique à pH 4,1, b) le même à pH 3,6, c) le même à pH 3,6 et additionné de moût concentré, d) un vin vieux

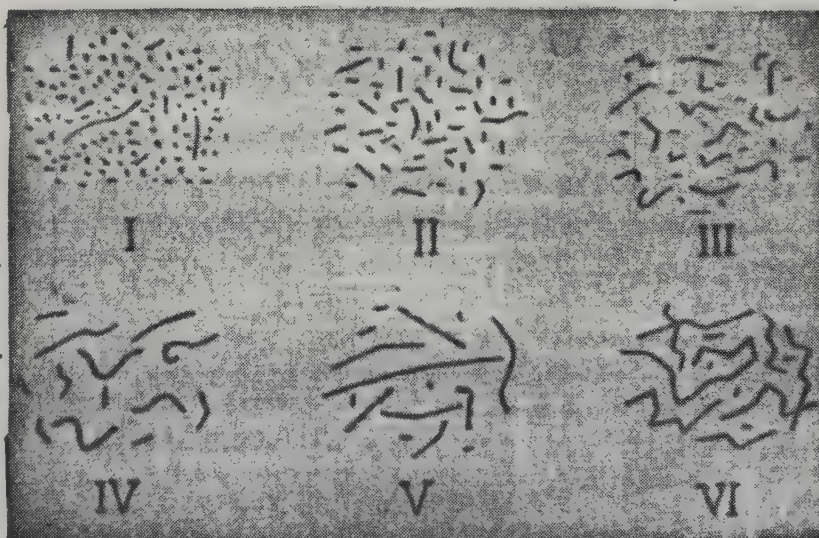
dont le pH était de 4,3. Ces cultures pures furent testées dans le tableau que nous reproduisons. Comme chacune d'elles ensemencée à plusieurs reprises dans le même milieu présenta les propriétés constantes, un classement fut possible.

CLASSIFICATION DES BACTERIES selon RIBEREAU-GAYON. (Tableau XIII)									
N° des Bactéries	Mil-lési-mes.	pH=3,1 ac=140	pH=3,3 ac=128	pH=3,49 ac=114	pH=3,74 ac=100	pH=3,95 ac=84	Ac tartri- pH 4 env ac=32	Ac mali- pH 3,5 env ac=100	
Bactéries du groupe 'M' ne décomposant pas l'acide tartrique;									
		a	a b c	a b c	a b c	a b c	a b c	a b c	a b c
B 1	1935	32	34 6 V	32 11 III	28 7 I	26 6 I		62 5	
B 2	1934	16	40 6 II	38 7 I	36 7 I	32 7 I		54 9	
B 3	1934	8	36 6 IV	36 7 II	36 4 I	30 6 I		54 9 I	
B 4	1935		36 5 III	36 4 II	38 6 II	32 8 I		52 8 II	
B 5	1933		38 6 I	34 9 I	36 6 I	32 8 II		58 10 II	
B 6	1931		30 2 V	34 8 III	28 8 II	16 16 II		60 5 II	
B 7	1935		34 5 III	38 6 II	34 8 II	32 10 III		56 9 I	
B 8	1935		12 1 II	38 6 III	32 8 I	28 11 III		54 5	
B 9	1931		10 1	34 7 II	30 7 I	20 16 II		62 5 II	
B 10	1929			30 6 IV	30 4 IV	28 5 IV		74 9 II	
B 11	1934			40 6 II	40 6 II	32 9 III		58 8	
Bactéries du groupe 'T' décomposant l'acide tartrique.									
		a	a b c	a b c	a b c	a b c	a b c	a b c	a b c
B 12	1929			22 12 IV	38 19 VI	32 21 VI	16 136	38 18 IV	
B 13	1929			40 17 VI	36 21 III	32 23 III	6 65	30 20	
B 14	1929			42 17 V	36 23 IV	30 25 V	32 92 II	56 13 II	
B 15	1929			40 20 VI	28 18 III	28 18 VI	32 100 II	56 9 II	
B 16	1934			34 21 VI	36 14 IV	32 16 V	8 120	16 20 V	
B 17	1933			38 22 VI	36 18 IV	32 21 IV	10 140 II	38 15 IV	
B 18	1929			28 3 VI	36 13 VI	34 14 VI	20 139 II	54 10 I	
B 19	1929				40 18 VI	36 20 IV	12 133 III	38 17 II	
B 20	1929				32 21 VI	12 43 VI	0 148 II	44 17 II	

LEGENDE

a) diminution d'acidité totale en méq.
b) augmentation d'acidité volatile en méq.
c) en chiffres romains aspect morphologique. Fig 2 Note. Au bout de 120 jours la décomposition a été complète à pH=3,10, pour B 1, B 2 et B 3, aucune attaque pour les autres. Comme température optimale, l'auteur indique 25°/27°C pour son expérimentation.

Fig 2



(extraite du Traité d'Oenologie. RIBEREAU-GAYON. 1949. autorisation de l'auteur;) (I34)

Pour la facilité de déclenchement de la fermentation malolactique par ensemencement, RIBEREAU-GAYON, en accord avec les chercheurs suisses, signale que même avec des bactéries

du type 'M' B 1, M B 2, M B 3 résistantes à l'acidité, on ne peut guère attendre de résultats certains; le meilleur étant obtenu par coupage de vin rétrogradé et non rétrogradé. Ce fait d'obtenir la rétrogradation de l'acide malique, plus facilement par coupage 25 ou 50 %, que par ensemencement, permet de supposer que des facteurs de croissance sont indispensables au développement des bactéries, en effet un vin non rétrogradé ne possède pas ces facteurs, un ensemencement dans celui-ci est négatif; un coupage par apport de substances de croissance par contre, donne des résultats, cette théorie que nous défendons sera approfondie plus loin.

Parallèlement à cette étude Bordelaise, on trouve en Allemagne des travaux orientés sur cette désacidification. SCHANDERL (47) en 1942, observe que " Le bleuissement biologique des vins mousseux " est provoqué par des bactéries du type Bacterium gracile Muller-Thurgau et Osterwalder associées souvent à des coagulums d'albumines. Ces bactéries ne sont pas gênées par le CO₂, ajoute SCHANDERL, même à des pressions plus importantes (10 à 20 fois plus), elles ont besoin pour leur développement d'albumine ou des produits supérieurs de la décomposition de cette dernière. La levure vivante, et encore plus la levure morte, augmentent le taux d'albumine, les sels ammoniacaux accélèrent cette synthèse; les tanins eux en diminuent la teneur par coagulation de la fraction précipitable des matières albuminoïdes. Donc pour SCHANDERL à cette époque, le déclenchement de la rétrogradation malolactique est conditionné par l'autolyse des levures, leur synthèse d'albumines au cours de leur développement ou après celui-ci. Dans les mêmes temps, RIPPEL (48) pense tout à fait l'inverse puisqu'il s'exprime de la façon suivante pour expliquer le caractère capricieux de la fermentation malolactique : « Si la lie de levures et la levure en général avait, soit pendant son activité de fermentation (dissimilation) ou par suite de sa décomposition autolytique après la fermentation, une influence notable sur le développement des bactéries désacidifiantes, alors la désacidification ne serait pas du tout un problème, car il y a toujours de la levure ou de la lie de levures dans le vin nouveau. Il doit donc y avoir d'autres facteurs déterminants pour le développement des bactéries désacidifiantes. » L'existence de ces facteurs "biocatalyseurs" a été prouvée par l'auteur, en effectuant des ensemencements dans des jus de raisins et dans des vins, il concluait que c'est la baie du raisin qui était le siège de ces substances activantes. Ces éléments par leur faible présence dans le moût, ne donnent aucun apport calorifique aux bactéries, ils jouent simplement le rôle d'activateurs, RIPPEL souligne que l'acide malique est aux bactéries ce que le sucre est aux levures, l'un comme l'autre éléments nécessaires à la

substance vitale. Il ne présume pas que la décomposition autolytique de la levure exerce une influence activante sur la croissance des bactéries, il prouve cette thèse en réalisant l'expérience suivante: un litre de vin fraîchement fermenté (avant que la levure ne soit décomposée) est réduit à moitié par évaporation, un autre litre de vin qui est resté sur la lie 10 semaines est remué plusieurs fois; ces deux échantillons sont ensemencés avec Bactérium gracile; on note aucune activation provoquée par la levure sur ce microorganisme. RIPPEL n'a pu obtenir de développement de bactéries dans un vin déjà rétrogradé car: « les substances actives qui sont nécessaires à leur développement avaient été utilisées par la désacidification qui avait précédé » enfin il explique l'irrégularité de la désacidification biologique d'une année à l'autre en admettant que si la levure joue un rôle, c'est par ce que certaines années, elle consomme plus ou moins de ces facteurs indispensables aux bactéries. En résumé certains points de l'étude de RIPPEL nous semblent former une hypothèse correcte, notre recherche personnelle que nous verrons plus loin, montre que l'on peut diriger la levure dans la consommation de certains facteurs biochimiques, par contre, le fait de localiser ces derniers dans les baies du raisin est une thèse toute gratuite, puisque nous prouverons que ce sont les parties solides de la vendange qui contiennent ces substances.

La microflore lactique des vins s'enrichit par les 47 souches isolées en Amérique par VAUGHN, DOUGLAS et FORNACHON (49)

3 souches en Bacillus homofermentatifs.

21 souches en ...d°... hétérofermentatifs.

11 souches en coques homofermentatifs.

12 souches en ..d°.. hétérofermentatifs.

Les dosages d'acides malique et lactique effectués sur plusieurs centaines de vins californiens, par chromatographie, prouvent la fréquence élevée de la fermentation malolactique. De leur étude on peut déduire 5 types de bactéries formant 4 genres et toutes aptes à décomposer l'acide malique.

Lactobacillus Hilgardii

Lactobacillus brevis.

Lactobacillus delbrueckii

Leuconostoc.

Pédiococcus.

En 1950, LEMOIGNE (50) publie un travail sur la classification et la nutrition des ferments lactiques, il étudie en particulier la nutrition azotée, minérale, organique et vitaminique de ces microorganismes. C'est une

recherche générale de valeur, mais non spécifique aux bactéries lactiques pouvant se présenter dans les vins.

Dans les cidres, deux microorganismes sont isolés par CARR (51), l'un en forme de batonnet genre Lactobacillus, l'autre un coque du genre Leuconostoc, ils réduisent l'acide malique des cidres.

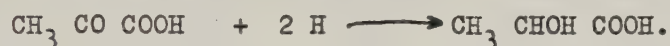
Toutes ces recherches, sont alors complétées par CHARPENTIE (52) celui-ci dans son " étude biochimique des facteurs de l'acidité des vins" est le premier, à notre connaissance, à donner une explication sur le mécanisme probable de la rétrogradation de l'acide malique, son schéma est le suivant:



soit déshydrogénéation de l'acide malique en acide oxalacétique.



puis décarboxylation de l'acide oxalacétique en acide pyruvique, ce dernier est ensuite réduit en acide lactique par l'hydrogène libéré dans la réaction(1)



CHARPENTIE a étudié aussi l'influence de l'acidité sur le déclenchement de la fermentation malolactique, nous reproduisons le tableau résumant ses expériences.

Influence du pH sur la fermentation malolactique selon CHARPENTIE. (tableau XIV)							
pH		Témoin non ensemencé	Origine des souches de bactéries				
			vin rouge pH = 3,3	vin rouge pH = 3,4	vin rouge pH = 3,6	vin blanc pH = 3,8	vin blanc pH = 3,87
2,95	Ac tot	I81,0	I47	I80	I80	I80	I80
	Ac vol	7,4	7,2	7,4	7,4	7,4	7,4
3,23	Ac tot	I60	II4	I09	I60	I57	I60
	Ac vol	7,4	7,4	7,2	7,2	7,4	7,4
3,40	Ac tot	I40	90	92	90	93	I36
	Ac vol	7,4	11,9	11,9	11,9	7,5	7,5
3,70	Ac tot	I08	74	74	63	73	79
	Ac vol	7,5	11,9	10,2	6,2	7,5	9,7
4,15	Ac tot	74	47	41	56	35	
	Ac vol	7,5	11,9	7,5	7,9	11,9	

les chiffres expriment les acidités totales et volatiles en méq/L.

Ce sont les bactéries isolées de vins à pH élevé qui ne fermentent pas ou difficilement, l'acide malique des milieux à pH faible.

Les effets de l'aérobiose et de l'anaérobiose, qu'il a expérimenté

tés,mettent en valeur le rôle de l'oxygène dont la présence favorise la rétrogradation de l'acide malique,alors que bien des auteurs classaient les bactéries lactiques comme anaérobies. Pour cette série d'essais, CHARPENTIE fait un parallèle entre le déolenchement malolactique et le potentiel d'oxydo-réduction,que nous reproduisons ici.

Influence de l'oxygène sur la fermentation malolactique selon CHARPENTIE.
(Tableau XV)

pH et acidité titration	Nombre de jours	EN AEROBIOSE			EN ANAEROBIOSE		
		potentiel sans mv	potentiel avec mv	diminution d'acidité még	potentiel sans mv	potentiel avec mv	diminution d'acidité még
pH 3,21 Ac=157még	8	540	500	22	370	310	35
	16	570	520	26	320	270	35
	24	550	535	29	330	280	35
pH 3,52 Ac=135még	8		480	25	340	240	35
	16	550	490	29	340	255	35
	24	570	510	29	300	240	35
pH 3,83 Ac=112még	8	540	480	32	330	240	35
	16	510	480	32	310	210	35

CHARPENTIE remarque alors que l'aérobiose et l'anaérobiose ne donnent pas de grosses différences sur la rétrogradation de l'acide malique, mais l'anaérobiose était effectuée par le pyrogallate à l'ensemencement, si bien que les deux vins à ce stade de départ étaient au même potentiel; il reprend donc ses essais en soumettant le vin 1 mois sous pyrogallate avant

Effet de l'anaérobiose absolue selon CHARPENTIE. (Tableau XVI)

pH	Nombre de jours	En aérobiose continue		En anaérobiose progressive		En anaérobiose immédiate ou absolue.	
		Potent. mv	Diminution d'acidité	Potent. mv	Diminution d'acidité	Potent. mv	Diminution d'acidité
pH 3,45	0	460	0	460	0	300	0
	6	440	8	300	8	310	0
	12	420	11	285	9	300	1
pH 3,82	0	450	0	460	0	260	0
	6	490	11	300	11	260	5
	12	470	11	260	11	270	6

l'ensemencement, c'est ce qu'il a appelé l'anaérobiose immédiate ou absolue. Son travail est complété par une étude du sulfitage des moûts et de son influence sur la désacidification des vins.

Les bactéries malolactiques modifient la teneur en ammoniac des vins, ARCHINARD et BOUDOT (53) ont analysé ce phénomène. Ils ont tout d'abord remarqué le caractère capricieux de la fermentation malolactique et l'augmentation d'ammoniac qui résulte de cette action microbienne dans les vins. Nous reproduisons ci dessous un tableau de ces auteurs.

Evolution de l'ammoniac dans les vins après fermentation malolactique selon ARCHINARD et BOUDOT. (Tableau XVII)						
Dénomination	VIN A L'ORIGINE			VIN APRES FERMENTATION MALOLACTIQUE		
	Acidité volatile.	Acidité totale.	Ammoniac mg/l	Acidité volatile.	Acidité totale.	Ammoniac mg/l
Bourgogne I939	0,40	6,20	13,6	0,5	5,1	25,5
Aligoté I939	0,40	5,50	10,6	1,2	6,2	15,3
Jura I941	0,45	6,45	6,8	0,5	5,1	18,7
Arbois I942	0,75	6,20	6,0	0,75	4,6	13,6
Bourgogne rouge I939	0,30	10,60	8,5	0,50	5,9	40,8
Montagny I939	0,15	7,10	10,0	0,30	7,0	30,6
Bourgogne blanc I950	0,25	7,00	10,2	0,45	4,70	13,6
Bourgogne rouge I950	0,45	9,3	11,9	0,55	6,30	25,8
Arbois I951	0,25	4,1	10,2	0,80	3,0	21,1

Jusqu'à ce jour, les bactéries étudiées au point de vue classification provenaient de vins acides suisses (MULLER THURGAU et OSTERWALDER), de vins argentins (ARENA), de vins de Californie (VAUGHN, DOUGLAS, FORNACHON) mais rien ne prouve que ce sont les mêmes germes que l'on retrouve dans les vins du Midi (blancs) ou dans les vins rouges, c'est pourquoi BIDAN (54) a réalisé un travail de valeur, sur la classification de bactéries malolactiques isolées de vins Français. L'origine des souches résulte d'isolements effectués à partir de lies de vins ayant terminé leur fermentation malolactique et dont

la provenance est l'Alsace (Riesling, Traminer, Sylvaner), le Nantais (Muscadet) le Tarn (Gaillac). Le milieu de culture est nouveau, voici sa composition:

Acide malique..... 2 g
 $\text{SO}_4\text{Mg } 7 \text{ H}_2\text{O}$ 0,100
 SO_4Fe traces
 $\text{SO}_4\text{Mn } 4 \text{ H}_2\text{O}$ traces
 Acétate de sodium..... 3 g
 Jus de tomates..... 25 ml
 CO_3Ca 1 g
 Eau de levure à 6 o/oo..... 1 litre.

La technique de BIDAN a été la suivante; dilution en milieu liquide avec enrichissement préalable par centrifugation pour supprimer les levures et repiquage, ce mode opératoire lui a permis d'obtenir 18 souches.

-I2 streptocoques dominant nettement dans la majorité des échantillons.

4 coques en tétrades ou paquets

2 bacilles souvent en chaînes.

BIDAN a étudié 4 de ces souches plus à fond

-ML₁ bacille isolé de Muscadet (I7-I0-55)

-ML₂ streptocoque isolé de Muscadet (I7-I0-55)

-ML₃ streptocoque isolé de Muscadet (20-I2-55) (issu de lie)

-ML₄ coque provenant de vin d'Alsace (mai 55) (Pinot gris).

Les caractéristiques sont les suivantes:

ML₁ Streptobacille; sur vin bacille de taille irrégulière. Croissance plus faible en aérobiose qu'en anaérobiose, donc microaérophile. Optimum de température 25 à 37°C. Germe voisin de Lactobacillus fermenti et de Lactobacillus Hilgardii et ressemblant à Bacterium intermedium.

ML₂ Streptocoque; sur vin coques légèrement allongées. Croissance plus faible en aérobiose qu'en anaérobiose, anaérobie facultatif. Optimum de température 25 à 32°C. Germe voisin de Leuconostoc citrovorum.

ML₃ Streptocoque; sur vin streptobacille fin. Anaérobie facultatif. Optimum de température 25 à 32°C. Se rapproche encore plus que ML₂ de Leuconostoc citrovorum; voisin de Bacterium gracile. L'auteur propose de l'appeler Leuconostoc gracile.

ML₄ Coque; sur vin grosses coques toujours groupées par 2 ou par 4. Croissance plus faible en anaérobiose qu'en aérobiose. Optimum de température 25 à 30°C. Très voisin de Pediococcus cerevisiae, mais n'attaquant pas le maltose. L'auteur propose de l'appeler Pediococcus vini, et il indique que vraisemblablement il s'agit du même microorganisme que Micrococcus variococcus de MULLER-THURGAU et OSTERWALDER et que celui décrit par SEIFERT: Micrococcus malolacticus.

Nous reproduisons un des tableaux de BIDAN résumant les caractères morphologiques et les tests en comparaison sur plusieurs souches de ferments lactiques et malolactiques.

Désignation	Forme	Dimensions en μ	Spores.	Pigment	Mobile	Gram	Caille le lait.	Réduction tournesol.	Liquéfaction gélatine.	Catalase	nitrites.	Formation A.M.C.	Indol.
<u>Lactob. Brevis.</u>	Batonnets	0,7-1 X 2-4	-	-	-	++	-	+	-	-	-	-	-
<u>Lactob. Fermentii</u>	Batonnets	0,5-1 X 3-15	-	-	-	++	-	+	-	-	-	-	-
<u>Lactob. Hilgardii.</u>	Batonnets	0,5-0,8 X 2-4	-	-	-	++	-	+	-	-	-	-	-
<u>Bacterium intermedium.</u>	Batonnets	0,8-0,9 X 1,2	-	-	-	++	-	+	-	-	-	-	-
<u>ML₁</u>	Batonnets	1 X 2-2,5	-	-	-	++	-	+	-	-	-	-	-
<u>Streptococcus lactis</u>	Streptocoques	0,5-1	-	-	-	++	-	+	-	-	-	-	-
<u>Leucon. mesenteroides</u>	Coques	0,6-1	-	-	-	++	-	+	-	-	-	-	-
<u>Leucon. dextranicum</u>	Coques	0,6-1	-	-	-	++	-	+	-	-	-	-	-
<u>Leucon. citrovorum</u>	Coques	0,6-1	-	-	-	++	-	+	-	-	-	-	-
<u>Bacterium gracile</u>	Batonnets	0,5 X 0,75	-	-	-	++	-	+	-	-	-	-	-
<u>Bacterium gracile CVRVV</u>	Streptocoques	0,3-0,5	-	-	-	++	-	+	-	-	-	-	-
<u>ML₂</u>	Streptocoques	0,3-0,5	-	-	-	++	-	+	-	-	-	-	-
<u>ML₃</u>	Streptocoques	0,2-0,5	-	-	-	++	-	+	-	-	-	-	-
<u>Micrococcus varians</u>	Coques	0,8-1	-	-	-	++	-	+	-	-	-	-	-
<u>Micrococ. acidovorax</u>	Coques	0,5-0,7	-	-	-	++	-	+	-	-	-	-	-
<u>Micrococcus variococcus</u>	Coques.	0,8-1,5	-	-	-	++	-	+	-	-	-	-	-
<u>Micrococcus malolacticus</u>	Coques	1	-	-	-	++	-	+	-	-	-	-	-
<u>Pediococcus cerevisiae</u>	Coques	1-1,3	-	-	-	++	-	+	-	-	-	-	-
<u>ML₄</u>	Coques	1-1,5	-	-	-	++	-	+	-	-	-	-	-

++ attaque forte. + attaque faible. - attaque ou n'attaque pas. - pas d'attaque.

Son étude se termine par l'examen de l'influence du pH envers la rétrogradation de l'acide malique. Le pH 4,00 est favorable, entre 3,5 et 4,0 on note un léger retard qui s'accroît considérablement en dessous de 3,80.

Cette excellente mise au point de BIDAN, avec sa comparaison entre les bactéries qu'il a isolées et celles des auteurs précédents, est d'une grande valeur. Comme nous allons pouvoir le constater dans la suite de cette bibliographie, nombreux sont les chercheurs qui se sont penchés sur la fermentation malolactique, à partir de cette époque.

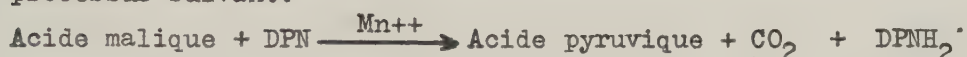
En 1957, JERCHER, FLESCHE et BAUER (55) examinent la dégradation de l'acide L-malique par Bacterium gracile. Ils comparent leurs souches avec celles de MULLER-THURGAU et OSTERWALDER sur le plan de la croissance et concluent que les types de bactéries qu'il ont isolés sont identiques à Bacterium gracile : croissance sur acides malique, citrique et sur glucose et fructose, mais aucune prolifération sur acide tartrique, ni sur saccharose, lactose, maltose et L-arabinose. La consommation en acides aminés est irrégulière d'une souche à l'autre; comme activateurs JERCHER, FLESCHE et BAUER nous indiquent l'acide pantoïque, la lactoflavine et l'inositol. Les auteurs enfin, dans l'étude biochimique de la rétrogradation montrent que la dégradation de l'acide malique en acide lactique peut se faire sans passer par l'acide oxaloacétique ou en passant par celui-ci, car des extraits sans cellules de Bacterium gracile peuvent réduire l'oxalacétate en présence de DPNH₂ ce qui met en évidence la malicodéshydrogène. La présence de β -décarboxylase, de lactodéshydrogène et de l'enzyme d'OCHOA, est prouvée aussi.

La rétrogradation malolactique dans les vins suisses provoque une amélioration de leurs caractères gustatifs, c'est ce qu'indique LUTHI (56) au début de son travail sur les vins et les cidres. Il mentionne que le pH et l'alcool ont une influence semblable sur le développement des bactéries, nous reproduisons ci-dessous les résultats de ses expériences effectuées sur un Pinot noir de 9,4° d'alcool avec des pH différents et sur le même Pinot noir de pH 3,2 et dont il fait varier la teneur en alcool.

Influence du pH		Influence de l'alcool	
pH	début de la rétrogradation	alcool	début de la rétrogradation
3,20	après 63 jours.	9°40	après 63 jours.
3,60	après 21 jours.	4°60	après 22 jours.
3,90	après 15 jours.	3°05	après 13 jours.
Influence du pH et de l'alcool d'après LUTHI.			

(Tableau XIX)

L'influence de l'azote apporté par l'autolyse des levures n'est pas négligeable, LUTHI cite à cet effet les travaux de CHALLINOR (57) qui a remarqué que la vitesse d'autolyse est plus grande à 25°C qu'à basse température. LUTHI indique que les travaux américains SALLES et OCHOA (58); et KORKES, DE CAMILLO et OCHOA (59) ont éclairé sous un autre angle le processus biochimique de la rétrogradation; en effet ces derniers ont réussi à isoler un " enzyme malique " en adaptant un Lactobacillus arabinosus à la dégradation de l'acide malique par addition de biotine au milieu. Des cellules lyophilisées de ce Lactobacillus, les américains ont pu extraire à l'acétone un élément très actif en présence d'ions manganèse, de phosphate monopotassique, d'extrait de levure et de glucose. Ces préparations enzymatiques permettant la décarboxylation de l'acide malique peuvent expliquer la réaction par le processus suivant:



Cette théorie est contraire à celle de CHARPENTIE puisque le cycle ne passe pas par l'acide oxalacétique. Le caractère endothermique de la fermentation malolactique déjà remarqué par SCHANDERL et RIPPEL fait supposer au chercheur suisse que l'énergie nécessaire aux bactéries provient de la décomposition des substances azotées, il donne un ensemble de chiffres provenant des études de BARAGIOLA et GODET sur l'évolution de l'azote. (59 bis)

Evolution de l'azote avec la fermentation malolactique. selon BARAGIOLA et GODET (extrait de l'étude de LUTHI) ref: (59 bis) (Tableau XX)		
	avant la rétrogradation	après la rétrogradation
Acidité totale	9,60 g/l	6,90 g/l
Acidité volatile	0,70 "	1,10 "
Acide lactique	1,50 "	4,70 "
Azote total	0,461 "	0,464 "
Azote ammoniacal	0,020 "	0,120 "
Azote albuminoïde	0,441 "	0,344 "
Protéine	2,46 "	2,15

Ces données sont en accord avec celles de ARCHINARD et BOUDOT (53) qui relataient une augmentation d'azote ammoniacal.

L'influence du manganèse est sensible, mais celle des acides aminés n'est pas négligeable non plus, LUTHI a communiqué dans son étude, un tableau de la consommation des amino-acides par Bacterium Gracile selon plusieurs chercheurs:

(Tableau XXI)

	LUTHI/VETSCH Bact Gracile.	JERCHEL/FLESCH/BAUER	
		Bact Gracile"5"	Bact Gracile"r"
Alanine	++	++	+
Serine;.....	0	++	++
Glycocolle.....	+	++	+
Thréonine.....	0	++	+
Acide glutamique.....	+	++	++
Proline.....	+	+	-
Arginine.....	+	+	+
Acide aspartique.....	0	+	++
Acide aminobutyrique.....	+	++	-
Légende			
0 = analyse non faite			
++ = forte réduction			
+ = faible réduction			
- = pas de réduction.			

Certaines analyses d'acides aminés par chromatographie sur papier, ont montré que la rétrogradation malolactique s'effectuait dans des vins contenant en faible quantité ces acides, c'est ce qui a incité l'auteur à former l'hypothèse que des acides aminés peuvent se remplacer mutuellement. En terminant, il indique qu'il a pu démontrer que la lactoflavine, l'acide pantothénique, l'acide nicotinique et l'acide folique sont indispensables à la croissance du Bacterium gracile.

L'Ecole Belge, par le microbiologiste LAMBION, s'intéresse aussi à ce phénomène, et en 1957 une étude du C.E.R.I.A de Bruxelles vient apporter ses connaissances sur ce problème sous la signature de LAMBION et MESKHI(60); ces derniers ont isolé de vins, de vins de fruits, de cidres, 26 souches de bactéries (batonnets et coques). Plusieurs milieux ont été essayés, certains additionnés d'acide sorbique pour éviter le développement des levures, les isolements résultent de dilutions successives (1 ml dans 9 ml) répétées 8 fois

Nous reproduisons le tableau de LAMBION et MESKHI donnant la liste des souches isolées, leur origine et leur aspect microscopique.

(Tableau XXII)		
LAMBION et MESKHI		
Numero de souche	Origine	Aspect microscopique
1	Vin de cerises Jaboulay I954	Bâtonnets courts en chaîne (7-8)
2	Vin de cerises Jaboulay I954	Gros bâtonnets allongés seuls ou par 2
3	Vin de cerises Jaboulay I954	Gros bâtonnets courts seuls ou par 2
4	Vin de cerises royales I954	Fins bâtonnets courts en chaînes
5	Vin de cerises royales I954	Petits bâtonnets courts par 2 ou en chaînes
6	Vin de cerises royales I954	Fins bâtonnets allongés en chaînes.
7	Vin de poires Callebasses à la Reine I954	Coques isolés ou par 2
8	Cidre nature I954	Bâtonnets courts épais
9	Cidre nature I954	Bâtonnets épais allongés en chaîne.
10	Vin de fruits malades I955	Coques isolés ou par 2
11	Vin de prunes I954	Fins bâtonnets courts par 2-3
12	Vin de poires I954	Petits bâtonnets en chaînes
13	Vin de pommes Reinettes I954	Petits bâtonnets courts en chaîne semblables à coques.
14	Vin de poires Bon Chrétien William I954	Gros bâtonnets seuls ou par 2
15	Médoc St Estèphe I954	Petits bâtonnets courts en chaîne
16	Beaune Station Oenolog.	Coques courts seuls ou par 2
17	Vin de poires Keuleman	Bâtonnets courts épais isolés
18	Vin de cerises	Bâtonnets allongés en chaîne
19	Traminer I955	Bâtonnets courts semb. à coques.
20	Traminer I955	Bâtonnets légèrement allongés
21	Vin Chiroubles Beaujolais I956 Rouge	Petits bâtonnets courts par 2, semblables à des coques
22	Vin St Amour Beaujolais I956 Rouge	Petits bâtonnets courts par 2, semblables à des coques
23	Vin de Liergues Bas Beaujolais I956 Rouge	Bâtonnets petits par 2
24	Vin de Vaux Beaujolais Village I956 Rouge	Bâtonnets petits par 2
25	Vin de prunes I955	Bâtonnets allongés seuls ou par 2
26	Vin de pommes et poires	Coques.

L'examen microscopique direct des échantillons qui ont subi la fermentation malolactique montre que dans la majorité il s'agit de bâtonnets. Dans l'isolement direct sur vin, on peut rencontrer sur celui-ci plusieurs types de bactéries lactiques en multiplication. Les chercheurs Belges après de nombreuses reproductions de chromatogrammes des tests de croissance, terminent en donnant les caractères communs aux bâtonnets :

Bâtonnets non mobiles, Gram positifs, donnant en aérobiose de toutes petites colonies microaérophiles translucides. Production uniquement d'acide lactique à partir des sucres utilisés. Catalases négatifs.

Ces caractères correspondent au genre Lactobacillus suivant Bergey.

Homofermentatifs sur glucose, alors que MULLER-THURGAU et OSTERWALDER ont trouvé, sur ce sucre, une légère acidité volatile; cependant MARQUES-GOMES, DA-SILVA-BABO et GUIMARES (61) sont en accord avec l'Ecole Belge.

Bonne croissance entre 25° et 37°C. Production d'acide lactique à partir du lactose (cet acide est inactif).

Ces caractères correspondent à Lactobacillus plantarum Orla Jensen Holland

La dénomination proposée par LAMBION et MESKHI pour les bâtonnets provoquant la fermentation malolactique est la suivante:

Lactobacillus plantarum var. gracile Müller-Thurgau Orla Jensen

Pour les coques, leur caractère hétérofermentatifs les fait classer dans le genre Leuconostoc. Il n'y a pas de production de dextrane avec le saccharose, mais production d'acide à partir de ce sucre et aussi des pentoses; les auteurs proposent donc de reprendre la proposition de BIDAN:

Leuconostoc mesenteroïdes var. gracile Van Thieghem Bidan

Enfin pour les coques homofermentatifs, une étude plus approfondie serait nécessaire, mais LAMBION et MESKHI proposent la terminologie de MIGULA (62):

Streptococcus vini Migula.

Comme la croissance sur acides organiques est faible, les microbiologistes Belges pensent que dans les vins les bactéries lactiques utilisent d'autres composés pour leur fournir l'énergie, ils citent les hexoses, les pentoses.

En Australie la rétrogradation malolactique est très courante, puisque FORNACHON (63) trouve sur 317 vins, 144 échantillons, soit 46 %, à avoir subi cette désacidification biologique.

Il indique comme facteurs influençant le déclenchement: l'alcool, le pH, le SO₂ et le temps de séjour sur grosses lies. L'auteur en accord avec AMERINE (64), AMERINE et JOSLYN(65) pense que la faible acidité des vins Californiens ne les fait pas classer dans ceux pour lesquels la fermentation malolactique est souhaitable. Voici un tableau de FORNACHON montrant des exemples de rétro-gradation de l'acide malique dans des vins pasteurisés et non pasteurisés.

Exemples de fermentation malolactique, comparaison entre vins pasteurisés et non pasteurisés.							
Selon FORNACHON. (Tableau XXIII)							
N°	Type de vin	pH	Ac. totale	Ac volatile	Ac Tartrique	Ac Malique	Ac Lactique.
1(a)	Rouge sec	3,75	82	5	28	35	4
1(b)	Rouge sec	3,92	63	7	24	6	19
1(c)	Rouge sec	3,94	61	5	25	7	18
2(a)	Rouge sec	3,67	89	5	30	41	4
2(b)	Rouge sec	3,82	65	7	29	5	23
3(a)	Blanc sec	3,64	93	6	24	37	5
3(b)	Blanc sec	3,73	78	8	22	7	18

Légende

(Résultats en méq/L)

1(a),2(a),3(a) pasteurisés à réception.

1(b),2(b),3(b) mêmes échantillons mais non pasteurisés.

1(c) échantillon de vin N°1,laissé au chai 6 mois.

Dans les cidres et autres boissons en dehors du vin, l'action des bacteries lactiques est discutée, suivant que le développement a lieu dans des jus acides dont il améliore la dégustation ou dans d'autres cas où il provoque des goûts indésirables; CARR(66) s'est penché sur ces développements microbiens. Il a isolé trois groupes de bactéries sur un milieu composé de jus de pommes, yeast-extract, agar + actidione ou 8-hydroxyquinoline; un groupe de bâtonnets homofermentatifs, un groupe de coques et un groupe de bâtonnets hétérofermentatifs. Les bâtonnets homofermentatifs sont d'un classement difficile une souche est voisine de Lactobacillus plantarum, l'autre de Lactobacillus casei, parmi ces dernières deux possèdent de la catalase, ce qui devrait les

mettre en dehors du genre Lactobacillus. L'auteur rattache le second groupe de coques à Leuconostoc mesenteroides, et enfin le troisième celui des bâtonnets hétérofermentatifs à Lactobacillus pastorianus var. quinicus, car ils ont une aptitude à réduire l'acide quinique en acide déhydroshikimique.

En Californie, on note aussi l'apparition de mauvais goûts provoqués par l'action des microorganismes malolactiques, c'est l'étude de VAUGHN et TCHELISTCHEFF (67). Ces derniers sont en accord avec KORKES, DEL CAMPILLO et OCHOA pour admettre l'acide pyruvique en stade intermédiaire du mécanisme malolactique, mais ils insistent sur la production de diacétyl et d'acétoïne responsables de la destruction ou du changement des qualités organoleptiques.

A notre connaissance, un des auteurs allemands à s'être le plus occupé de la fermentation malolactique, est RADLER, ses communications sont nombreuses, comme nous allons le voir au cours de cette bibliographie; la première que nous citerons est celle axée sur la réalisation expérimentale de cette dégradation de l'acide malique (68). Dans cette note, il rappelle qu'en ajoutant du sucre progressivement on ralentit la fermentation alcoolique et que ces conditions favorisent le développement des bactéries lactiques, cette observation, nous l'avons faite à peu près à la même époque dans le vignoble de Muscadet. (voir "Travaux personnels"). Il indique comme facteurs favorables (mais qui ne sont pas toujours suffisants) le long séjour sur lies, une température de conservation élevée, et l'absence de SO_2 . Il a obtenu le déclenchement malolactique sur moût, par ensemencement massif de bactéries, seul, ou jumelé avec un apport de levures, mais dans le vin l'ensemencement bactérien est inhibé dès que la teneur en alcool dépasse 6% en volume.

RADLER (69) a aussi obtenu des souches pures de bactéries lactiques par isolement sur plaques au jus de tomates. Un premier groupe de bâtonnets voisins de Lactobacillus plantarum, et trois autres groupes assimilés à Leuconostoc. Une remarque a été faite par l'auteur qui indique que les bactéries arrivent dans la cave avec la vendange, car elles se retrouvent sur les feuilles en Septembre-Octobre; ceci est tout à fait en accord avec les études de PEYNAUD et DOMERCQ (70) publiées dans les Comptes-Rendus de l'Académie des Sciences en 1961.

Certains critères de croissance sur jus de tomates, sont donnés dans une autre de ses notes (71). Il confirme le caractère endothermique de cette transformation de l'acide malique et pour les trois facteurs: pH, alcool et SO_2 , il indique les valeurs-seuil qui limitent la multiplication des

agents malolactiques: pH < 3,10, alcool > 18% en vol, SO₂ Total > 150 mg/l
Des cultures sont possibles sur milieu synthétique avec une petite source énergétique comme du glucose.

Cette source peut être très faible; comme il le montre dans une communication (72), c'est à dire de l'ordre de 0,15 % de sucre pour obtenir une décarboxylation de l'acide malique; ce sucre est transformé probablement en acide lactique (homofermentatifs) ou en acide lactique, alcool et gaz carbonique pour les hétérofermentatifs.

Le sucre, comme bien des facteurs de croissance, au dessus d'une certaine valeur provoque un ralentissement ou même un blocage; c'est le cas du saccharose (vers 200 g/l) vis à vis des Leuconostoc, alors que les Lactobacillus y sont insensibles. Cet autre travail de RADLER (73) ne se borne pas simplement au saccharose, mais aussi à l'alcool où les Lactobacillus sont plus résistants (12°) que les Leuconostoc (8°). Enfin le microbiologiste allemand fait remarquer que la concentration en acide tartrique n'a aucune influence.

C'est aussi l'avis de FLESCH et JERCHEL (74) non seulement pour la teneur en acide tartrique mais aussi en K. Ces derniers ont réussi à isoler une nouvelle souche se rapprochant encore plus de celle décrite par MULLER-THURGAU et dont la culture a été possible sur milieu synthétique de WRIGHT et SHEGGO (voir lexique). FLESCH et JERCHEL ont pu obtenir une accélération ou un déclenchement malolactique (dans des vins réfractaires) par addition tantôt d'hydrolysats de levures, de caséine, tantôt de mélanges d'acides aminés ou de vitamines; notre étude personnelle met bien en relief cette action des aminoacides.

Un chercheur Anglais CARR (75) étudie à la même époque les besoins en vitamines du groupe B pour les bactéries lactiques des cidres, il classe les vitamines en 3 catégories:

E) essentielles (pantothenate, acide nicotinique)

S) stimulantes.

N) non essentielles.

La riboflavine et la thiamine sont (E) mais pour un nombre décroissant de souches. La biotine, la pyridoxine et l'acide folique sont (N) dans la grande majorité des cas.

En Yougoslavie on se préoccupe aussi de cette altération bactérienne des vins; dans les Annales des Sciences Agronomiques de Belgrade, MILISAVLJEVIC (76) publie une étude sur les vins yougoslaves ; nous empruntons les lignes qui vont suivre au résumé en Français paru dans ces Annales: « La fermentation malolactique est certainement l'un des problèmes les plus importants de l'oenologie moderne. C'est ce qui justifie les efforts que font de nombreux chercheurs pour l'étudier. Ces dix dernières années nos connaissances sur cette 'désacidification biologique' se sont assez approfondies , mais elles sont encore insuffisantes, tout au moins en ce qui concerne l'aspect microbiologique du problème. Pour cette raison précisément nous ne sommes pas encore en possibilité d'obtenir la fermentation malolactique à volonté et nous ne savons pas la guider, comme nous savons guider la fermentation alcoolique, par exemple. D'autre part la question se pose toujours de savoir si la fermentation malolactique est toujours désirable, même pour les vins d'acidité moyenne ou basse. »

La fréquence de cette fermentation dans diverses parties du territoire, est mise en évidence par le tableau suivant:

Aperçus des résultats de recherche de l'acide malique dans les vins exposés aux foires de Ljubljana (1956) et Novi-Sad (1956 et 1957)				
Selon MILISAVLJEVIC (Tableau XXIV)				
République populaire.	Nombre d'échantillons de vins examinés			Pourcentage contenant de l'acide Malique.
	Contenant de l'acide malique.	Ne contenant pas d'acide malique.	Total	
Serbie	51	105	156	33%
Croatie	20	17	37	54%
Slovénie	56	3	59	95%
Macédoine	1	0	1	-
Bosnie et Herzégovine	0	2	2	-
ENSEMBLE....	128	127	255	50%

Il est facile de remarquer que 50% des vins rétrogradent en moyenne; dans la Slovénie on note une fréquence beaucoup plus faible, cela est dû, comme le souligne l'auteur, à l'acidité initiale beaucoup plus élevée. Pour MILISAVLJEVIC la fermentation malolactique apparaît 1 à 2 mois après la vinification, ou ce qui est un cas plus fréquent, au printemps de l'année

suivante. Le développement des bactéries malolactiques est influencé par la race de la levure et l'auteur Yougoslave dans un tableau donne les résultats de deux races de levures S 4 et 25 C. (il s'agit de la race de levure qui a provoquée la fermentation alcoolique)

Influence de la race de la levure sur la fermentation malolactique. Selon MILISAVLJEVIC. (Tableau XXV)		
Année	Race de la levure	Nombre de Jours écoulés depuis le début de la fermentation alcoolique jusqu'à l'achèvement de la rétrogradation malolactique.
1955	S 4	248 jours
1955	25 C	106 jours
1956	S 4	216 jours
1956	25 C	71 jours
1957	S 4	127 jours
1957	25 C	37 jours

De son étude des trois facteurs : Alcool, acidité et SO_2 , il déduit qu'ils agissent ensemble et qu'il est difficile de parler de concentration limite ou bactériostatique pour un de ces éléments pris séparément. Par exemple, pour un vin de 13° d'alcool, la fermentation malolactique a été empêchée avec 50 mg/L à pH 3,22, mais à pH 3,46 la dose inhibitrice a dû être portée à 75 mg/L, et 100 mg/L n'ont pas été suffisants avec un pH de 3,85.

En 1958, RADLER (77) complète ses travaux sur la désacidification biologique des vins, celle-ci, indique-t-il, est provoquée par des bactéries se trouvant sur les raisins et pénétrant ainsi dans le moût. La moitié des bactéries isolées par les feuilles de la vigne sont capables de décomposer l'acide malique d'une manière anaérobie.

Les recherches de CARLES, M. LAMAZOU-BETBEDER et R. PECH (78) apportent une théorie nouvelle de la fermentation malolactique. Sur tous les chromatogrammes d'acides organiques effectués sur des vins, les auteurs trouvent l'acide citramalique à un taux presque égal à celui de l'acide citrique, ils chiffrent à 2% sa contribution à l'acidité représentée par les acides organiques. Son origine ? CARLES, M. LAMAZOU-BETBEDER et R. PECH l'envisagent dans une décarboxylation de l'acide citrique. Dans le vin plusieurs transformations de ce

genre se produisent: l'acide glutamique donne naissance à l'acide γ -aminobutyrique, l'acide malique est décarboxylé en acide lactique. Pour ces chercheurs il existerait donc à côté de la fermentation malolactique une fermentation citramalique. Ils ont remarqué que dans le moût à peine fermenté, dès qu'apparaît l'acide succinique apparaissent quelques traces d'acide citramalique; ils forment alors l'hypothèse suivante: « La seconde décarboxylation, la fermentation malolactique, ne serait-elle que la recrudescence d'une première fermentation décarboxylante qui se serait produite pendant la fermentation alcoolique et à laquelle nous devrions un peu d'acide lactique et la plus grande part de l'acide citramalique ? ou bien la petite quantité d'acide lactique, apparue avant la fermentation malolactique proprement dite, proviendrait-elle directement des glucides par l'intermédiaire de levures ou de bactéries? » Les physiologistes de Toulouse ne se prononcent pas.

En Bourgogne, BERGERET (79) étudie cette désacidification biologique sur les vins des vendanges de 1957, dans cette région, souligne-t-il, les soutirages sont un handicap pour le déclenchement de la rétrogradation. Mais par contre elle s'est effectuée dans des vins dont le pH était inférieur à 3,0 et l'acidité de titration élevée.

Dans son "Traité d'oenologie Bourguignonne" paru en 1958, FERRE (7) met bien en relief que la fermentation malolactique est conditionnée par un ensemble de facteurs physiques ou chimiques dont l'influence est inconnue ou non approfondie; ces éléments proviendraient de l'autolyse des levures. Cette conclusion est conforme aux études de BENVEGNIN (79bis) comme l'indique FERRE lui-même. Ses observations l'amènent à écrire les lignes suivantes: « Il doit exister dans les vins des substances que l'analyse courante ne permet pas encore de déceler et qui ont soit une action inhibitrice, soit une action stimulante. C'est ce qui expliquerait que la fermentation malolactique est assez irrégulière. »

Ces "facteurs" dont FERRE fait allusion, sont étudiés par LUTHI et VETSCH (80) avec un intérêt particulier sur les purines, aminoacides et vitamines. Pour ces deux derniers auteurs, l'influence du sucre et de l'acide citrique est fondamentale; des molécules complexes (petits polypeptides) sont nécessaires au développement des bactéries. Pour certains chercheurs les acides aminés sont indispensables, pour d'autres non ou tout au moins d'une façon irrégulière, et c'est aussi l'avis de LUTHI et VETSCH puisqu'ils écrivent: « dans certains cas les aminoacides peuvent être désaminés et servir de source d'énergie ».

Peu à peu les connaissances augmentent sur ce problème de la désacidification biologique des vins, sans pour autant le solutionner; aussi en 1959 (21 et 22 Mai) le Colloque Oenologique de Mâcon a pour thème: La Fermentation malolactique.

Dans son rapport à cette réunion, l'Ecole de Bordeaux par la voix de messieurs SUDRAUD et CASSIGNARD (81) mentionne les effets de la température, l'action inhibitrice des polyphénols et l'hypothèse que certains acides aminés aient une part importante dans la multiplication des bactéries malolactiques .

Les avis sont très partagés pour les polyphénols, puisque MICHEL (82) cite à cette manifestation que les vins rouges plus riches en ces éléments que les vins blancs , sont plus sujets à la rétrogradation. C'est par leur pouvoir réducteur, que ces substances agissent en abaissant le potentiel d'oxydoréduction; MICHEL accorde d'ailleurs une très grosse importance à ce facteur physique de l'état oxydo-réducteur d'un vin. Il apporte une pierre à l'édifice de nos investigations par les constatations qu'il a enregistré de la part du Directeur de la Cave Cooperative Centrale de Stuttgart qui vinifie 50.000 hl de vin rouge sous pression de CO_2 depuis la fermentation jusqu'au tirage. Pendant leur conservation les vins sont logés en cuves climatisées et leur fermentation malolactique évolue bien malgré un pH d'origine très bas, devons nous conclure à une influence favorable du CO_2 ? nous en reparlerons plus loin, au cours d'analyses de travaux plus récents.

En Alsace (vins se rapprochant des Muscadets) SCHWARTZ (83) dans son rapport à ce congrès précise que pour les Riesling et les Traminer cette désacidification biologique n'est pas bénéfique pour leurs caractères organoleptiques, l'acidité servant de support à ces derniers.

Pour clore l'ensemble des exposés, BIDAN (84) présente une étude ayant pour titre: "Les germes de la fermentation malolactique", il fait remarquer que le milieu de culture a une grosse influence pour la morphologie; par exemple Bacterium Gracile à pH 6, se présente comme un streptocoque, mais dans des conditions optimales de pH et sans alcool, il prend la forme de coques de 0,5 μ . Dans un milieu contenant 14% d'alcool il se développe en chaîne souvent très longue, si la teneur en magnésium est importante, ce germe en milieu acide devient streptobacille fin.

Nous reproduisons ensuite les caractères communs aux germes de la fermentation malolactique, selon BIDAN.

1°) Caractères communs aux germes de la fermentation malolactique.
selon BIDAN.

Type.....Ferments lactiques.
Famille.....Lactobacillacées.
Produit principal à partir des sucres.....Acide lactique.
Formation de spores.....Négative.
Pigmentation.....Non.
Mobilité, liquéfaction de la gélatine.....Non.
Gram.....Positif.
Catalase.....Négative.
Croissance.....Faible.
Formation des nitrites à partir des nitrates.....Négative.
Formation d'acétyl-méthyl-carbinol.....Négative.
Formation d'indol.....Négative.
Donnant de très petites colonies à la surface des milieux solides, ils attaquent l'acide malique en produisant de l'acide lactique et du gaz carbonique. Ils attaquent le glucose et le lévulose (avec plus de facilité pour ce dernier) en produisant des acides. Ils sont micro-aérophiles.

2°) Caractères par lesquels les germes de la fermentation malolactique diffèrent. selon BIDAN.

a) au point de vue morphologie.

- Bâtonnets.....isolés, par 2, ou en chaînes
(bacilles et streptobacilles): lactobacilles.
- Coques.....isolées, par 2, ou en chaînes.
 - Leuconostoc: (streptocoques ou streptobacilles fins)
 - Pédiocoques: (coques, amas, tétrades ou courtes chaînes)
 - Streptocoques: (chaînes de coques) (rares)

dimensions $0,3 \mu$ à 15μ .

b) au point de vue physiologie.

- Homofermentatifs.....bâtonnets (lactobacilles)
coques (pédiocoques)
- Hétérofermentatifs...bâtonnets (lactobacilles)
coques (leuconostoc)

c) enfin les germes diffèrent par l'attaque des sucres.

- arabinose et xylose attaqués.....pour les pentoses.
- galactose attaqué parfois.....pour les hexoses.
- saccharose, lactose, maltose attaqués..pour les disaccharides.
- raffinose attaqué quelquefois.....pour les trisaccharides.
- glycérol rarement attaqué.

Certaines bacteries (leuconostoc) sont capables de donner des vins filants; et enfin des variations de production d'alcool, de mannitol (différenciant les hétérofermentatifs des homofermentatifs) d'attaque de l'acide citrique, et c, permettent de trier ces microorganismes malolactiques.

DUPUY (85) complète ce premier exposé de la Station de Technologie de Versailles, par une synthèse générale des études orientées sur "les facteurs agissant sur les bacteries malolactiques". Certains auteurs, dit-il, ayant observé le caractère endothermique de la fermentation malolactique, pensent que l'apport d'énergie indispensable peut être fourni par dégradation des protides (BARAGIOLA et GODET. 1914), (HENNIG et OHSKE. 1924), (SCHANDERL. 1950) et d'autres par métabolisme des glucides en particulier du lévulose. Dans le domaine des acides aminés et des vitamines, les avis sont très partagés, certains voient dans l'autolyse des levures la source de ces composés, (c'est ce que nous avons trouvé avec SCHANDERL (47)); pour d'autres chercheurs c'est le raisin lui-même qui les apporte. RIPPEL (48).

DUPUY donne ensuite une énumération des acides aminés et vitamines dont l'apport dans les vins n'a donné aucun résultat.

Thiamine, ... 100 γ/L
 Riboflavine, ... 100 γ/L
 Biotine, ... 1 mg /L
 Acide nicotinique, ... 10 mg /L
 (station de Pully, Lausanne 1948)
 Acide pr. amino-benzoïque (KIELHOFFER 1947)
 Thiamine, essais demandés par HOFFMANN LAROCHE en
 Suisse, France, Italie 1952-1954.

Puis il cite la liste des constituants indispensables au développement de ces bacteries établie par RADLER.

Acide folique, ... indispensable pour 4/5 (confirmé par LUTHI 1957)
 Acide nicotinique, ... indis. 5/5 (conf. FIESCH JERCHER 1958. LUTHI 1957)
 Acide pantothénique, ... indis. 1/5 (conf LUTHI 1957)
 L.Arginine, ... indis. 3/4
 L.Cystine/cysteine, ... indis. 2/3
 L.Glutamique, ... indis. 4/4
 L.Histidine, ... indis. 3/4
 D.L. Leucine, ... indis. 4/4
 D.L. Phénylalanine, ... indis. 3/4

D.L.Sérine.....indispensable pour les 2/4
L.Tryptophane.....indisp.....2/3
L.Tyrosine.....indisp.....2/3
D.L.Valine.....indisp.....4/4

P.amino-benzoïque FLESCH et JERCHEL (1958)

Inositol FLESCH et JERCHEL (1958)

Biotine + Thiamine FLESCH et JERCHEL (1958)

Dans l'énumération des facteurs inhibiteurs, DUPUY indique pour terminer, que les éléments : alcool, pH, SO_2 , température ont un effet sur les bactéries malolactiques. Certains composés polyphénoliques ont aussi des propriétés inhibitrices. (voir DUPUY et MELAMED (89)

Tirons simplement la conclusion; les avis sont partagés et parfois opposés, surtout pour les acides aminés et les vitamines..

Dans les échanges de vues terminant ce colloque, CORDONNIER (86) rapporteur de la région du Midi, signale que la faiblesse de l'acidité des moûts en année normale pour ce vignoble, ne fait pas souhaiter la fermentation malolactique, les vins perdant leur fraîcheur, leur couleur (par oxydation) et leur fruit. CORDONNIER fait remarquer la difficulté du problème pour favoriser ou non cette désacidification biologique; dans la fin de son exposé il s'exprime ainsi: « un autre aspect très important du point de vue biologique est le phénomène extrêmement complexe des rapports de la bactérie avec les levures ».

Ce "Colloque Oenologique de Mâcon", orienté sur la fermentation malolactique, fait une synthèse générale des études, avancement faible il faut l'avouer. Cependant les recherches se complètent, certaines sont axées sur la microbiologie, d'autres comme l'Ecole de Bordeaux en 1959, vont vers une technique tendant à provoquer la désacidification malique. PEYNAUD et S.DOMERCQ (87) dans leur mode opératoire, partent de levains établis avec des vins ayant subi récemment la fermentation malolactique. Ces levains composés moitié jus de raisin moitié d'une solution d'extrait de levure à 5 g/L, sont ajustés à pH 4,2. La prolifération est rapide et au bout de 4 à 5 jours d'incubation, le liquide de cette culture contient 100.000 à 200.000 bactéries par millimètre cube. L'avantage de l'ensemencement en moût, précisent les auteurs, réside dans le fait que celui-ci est beaucoup plus apte que le vin au développement bactérien. Un litre de levain à 100.000 bact/mm³, ajouté à une cuve de 100 hl, réalise une population dans le moût de 10.000 bact/cm³, ce qui est suffisant pour

obtenir le déclenchement malolactique. On note deux observations intéressantes des chercheurs Bordelais:

1°. Certaines levures s'opposent au déclenchement.

2°. L'ensemencement réalisé à l'aide de culture de bactéries provenant d'une seule cellule, s'est montré aussi efficace que celui utilisant l'ensemble des bactéries ayant désacidifié un vin; ce qui élimine l'hypothèse d'une symbiose de microorganismes.

S.DOMERCQ en collaboration avec SUDRAUD et CASSIGNARD (88) publie au Congrès des Sociétés Savantes de Dijon, un travail de même orientation "Sur la possibilité d'obtenir rapidement la fermentation malolactique des vins". Au cours de cette recherche, les auteurs ont enregistré quelques critères: température optimale 21°C à 27°C, (ralentissement à 17 et 33°C), influence défavorable de l'oxygène et des polyphénols en forte concentration (vins de presse).

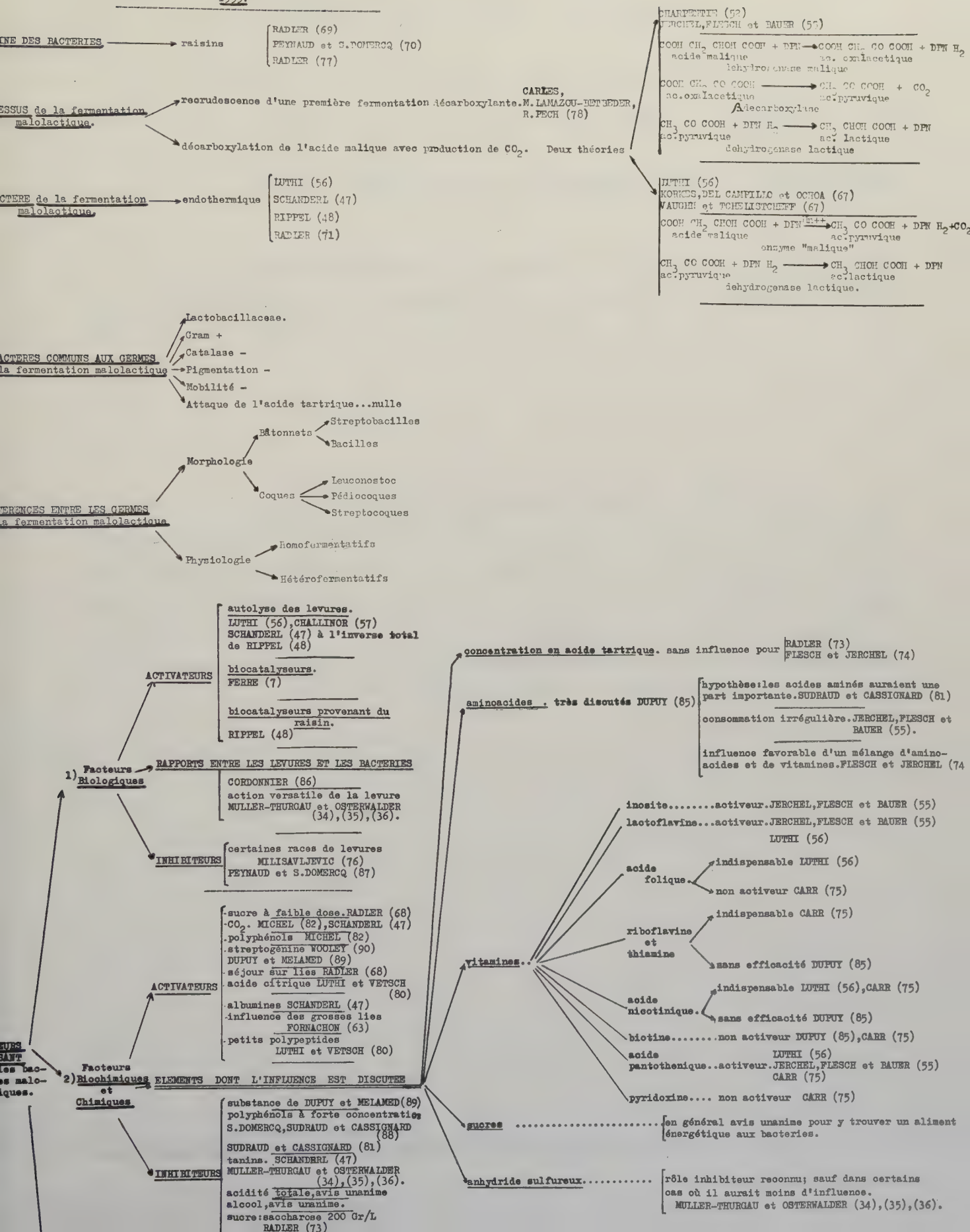
La croissance d'une seule bactérie cette fois, est observée en détail par DUPUY et MELAMED (89); il s'agit du Lactobacillus arabinosus. Comme les bactéries lactiques sont très exigeantes en facteurs de croissance, ces biologistes évitent la stérilisation par chauffage en appliquant la technique de filtration sur plaques en verre fritté. Un traitement du milieu de culture avec des enzymes pectinolytiques est indispensable pour avoir un débit suffisant. L'influence possible de ces enzymes sur la croissance de Lactobacillus arabinosus, est analysée au cours d'essais préliminaires; cette action est d'ailleurs nulle. A côté des tests de l'alcool, du pH, on trouve une autre expérimentation avec ce même microorganisme, sur le rôle d'une substance découverte par WOOLLEY (90): "la Streptogénine". Il s'agit d'un facteur contenu dans certaines préparations de trypsine et ayant des propriétés d'activation pour la prolifération des Lactobacillus et des Streptococcus. Les expériences portant sur les propriétés chimiques de la Streptogénine prouvèrent que ce corps était un peptide ou une substance analogue aux peptides. WOOLLEY après étude, compara la Streptogénine avec un composé qui avait des propriétés inversées avec elle. Il s'agissait de la Lycomarasmine, isomère de l'acide séryl-glycyl-aspartique; par opposition WOOLLEY a donc pensé que la structure de la Streptogénine pouvait être très proche de l'acide séryl-glycyl-glutamique. En effet cet auteur rappelle qu'un changement minime de la composition chimique d'une vitamine, provoque souvent la transformation de cette dernière en une substance antagoniste. L'acide séryl-glycyl-aspartique présentant une activité analogue à celle de la Lycomarasmine, l'acide séryl-glycyl-glutamique fut synthétisé et il fut trouvé que non seulement il était antagoniste de la

Lycomarasmine, mais qu'il avait aussi une certaine activité streptogénique. Cette propriété renforçait donc l'opinion que ce dernier acide avait un rapport avec la Streptogénine, sans toutefois prouver une identité complète. L'hypothèse pratique était donc émise que la Lycomarasmine était une anti-streptogénine naturelle dans laquelle l'acide glutamique du facteur de croissance avait été remplacé par l'acide aspartique. DUPUY et MELAMED (89) rapportent que WOOLLEY a synthétisé d'autres tripeptides de l'acide glutamique pourvus des mêmes propriétés vis à vis de Lactobacillus arabinosus.

Ces deux mêmes auteurs (89) ont essayé la bactotryptone "Difco", qui est préparée à partir d'hydrolysats tryptiques de protéines, pour observer son action sur Lactobacillus arabinosus; elle permet d'obtenir une croissance à un pH plus bas et augmente la résistance à l'alcool. Ce travail sur le développement de Lactobacillus arabinosus est augmenté d'une autre étude, sur la présence dans le jus de raisin d'un produit inhibiteur de ce microorganisme. Ce facteur est précipitable par la gélatine ou la caseïne. DUPUY (85) au Colloque Oenologique de Mâcon, ajoutait que ce corps inhibiteur est extractible par l'acétate d'éthyle et que cet extractif soumis à la chromatographie, la fraction toxique se situait dans une bande fortement fluorescente.

Dans leur expérimentation, DUPUY et MELAMED (89), ont observé que la croissance sur jus de raisin devient de plus en plus difficile au fur et à mesure que le jus vieillit.

Nous profiterons du "Colloque Oenologique de Mâcon", première manifestation oenologique ayant pour sujet la fermentation malolactique, pour arrêter la bibliographie dans son ordre chronologique et pour faire le point de tous les travaux publiés jusqu'en 1959, sous la forme d'un tableau synoptique.



HISTORIQUE (suite)

B) Travaux publiés sur la fermentation malolactique de 1959 aux recherches récentes.

L'étude panoramique du phénomène malolactique sera réalisée dans les pages qui vont suivre, en comparant chaque paragraphe du tableau précédent avec les recherches effectuées jusqu'à nos jours.

§ 1. Origine des bactéries.

La mise au point de PEYNAUD et S.DOMERCQ (70) nous apprend que les bactéries lactiques sont moins répandues, sur la vigne, que les levures et les bactéries acétiques; mais que cependant dans 16% des échantillons de raisins il a été prouvé la présence de flore malolactique. HUSFELD (91) rapporte à l'Office International de la Vigne et du Vin, qu'il n'est pas indubitable que les bactéries trouvées sur les feuilles de vigne (et capables de décarboxyler anaérobiquement l'acide malique), soient les mêmes que celles de la dégradation biologique de l'acidité des vins. WEBB et INGRAHAM (92) eux, voient dans le matériel vinaire (cuvier de fermentation) le lieu d'origine des micro-organismes lactiques; mais à notre connaissance, cette hypothèse est peu probable, et d'autres auteurs ont confirmé les observations de PEYNAUD et S.DOMERCQ, citons en particulier le BULLETIN D'INFORMATION DU MINISTERE DE L'AGRICULTURE (93) et BENVEGNIN, CAPT et FIGUET (94). Certains chercheurs vont même jusqu'à préciser que les bactéries s'accumulent petit à petit dans la pruine recouvrant le grain de raisin. MICHOD et FELL (95). Récemment, à la première réunion de la Sous-Commission de Microbiologie du Vin (4) le 29 Avril 1964, MILISAVLJEVIC nommé Président s'exprimait ainsi : «il convient d'étudier la fréquence des bactéries malolactiques indigènes lors de la vendange, en prélevant directement des grappes de raisin et en étudiant les bactéries qui s'y trouvent.»

Une autre preuve de l'existence de Bacterium gracile au niveau

botanique, nous est donnée par OCHS (96) qui attribue à ce microbe la cause de la maladie de paralysie des pétioles de la vigne.

La présence constante de bactéries attaquant l'acide malique, reconnue par RIBEREAU-GAYON (102) dans les sols des caves et des chais n'exclut pas leur origine sur la vigne, car leur culture est entretenue dans ces locaux humides, tout au moins à l'état de vie ralentie.

Enfin, nos recherches personnelles abondent dans le sens général, puisque le déclenchement malolactique fut immédiat au cours de certains de nos essais, alors que le prélèvement du moût était fait directement au pressoir ou au foulopompe.

§ 2 . Processus de la fermentation malolactique.

Comme nous l'avons vu par les travaux de JERCHEL, FLESCH et BAUER (55), la décarboxylation de l'acide malique peut se faire en admettant comme stades intermédiaires:

- soit: a) l'acide oxalacétique et l'acide pyruvique (avec DPN, deshydrogénase malique, β -décarboxylase et deshydrogénase lactique)
- ou : b) simplement l'acide pyruvique (avec DPN, enzyme malique et deshydrogénase lactique).

La présence des enzymes mises en jeu dans l'un et l'autre cas ayant été démontrée, nous pouvons admettre les deux mécanismes (a) et (b). Comme le rapportent RIBEREAU-GAYON et PEYNAUD (12), la deshydrogénase malique, la β décarboxylase et la deshydrogénase lactique ont été caractérisées dans le produit d'autolyse des bactéries sous toluol; l'enzyme malique a été mise en évidence après éclatement des cellules de bactéries avec de la poudre d'alumine, au broyeur.

Pour le mécanisme (b), d'après les recherches de RUTTER et LARDY (97), il ne s'agirait peut-être que d'une seule enzyme et les réactions seraient plus simples.

§ 3. Caractère de la fermentation malolactique.

Les publications ,à notre connaissance, sont unanimes pour accorder un caractère endothermique à la fermentation malolactique, puisque le potentiel énergétique de l'acide lactique est supérieur à celui de l'acide malique.

Potentiel énergétique de l'acide malique: 320 calories/mol.

Potentiel énergétique de l'acide lactique: 326 calories/mol.

D'où provient cette énergie ? Dans quel élément les bactéries la puisent-elles ? Ce sera l'objet du paragraphe important, traitant des facteurs.

RADLER (72) nous indique que les glucides doivent nécessairement servir d'aliment aux bactéries, mais que les quantités exigées sont très faibles: 1 Gramme d'acide malique (gauche) est décomposé par 10 mg de poids sec de bactéries, avec une utilisation de 0,10 Gr de glucides. Cette transformation, dans le cas d'agents hétérofermentatifs, donne 0,05 g d'acide lactique, 0,026 g d'alcool et 0,022 g de CO₂. Ces faibles variations ne sont pas facilement décelables dans l'analyse d'un vin; comme le précise RIBEREAU-GAYON et PEYNAUD (12). Ces derniers ont observé une baisse de mésoinositol dans le vin au cours de la dégradation de l'acide malique, nous reproduisons leurs chiffres.

ATTAQUE DU MESOINOSITOL AU COURS DE FERMENTATIONS MALOLACTIQUES. selon RIBEREAU-GAYON et PEYNAUD. (Tableau XXVII)								
N° des vins	Degré	pH	Acidité volatile			Mésoinositol		
			à l'ori- gine.	après 5mois au pH du vin	apr. 5 mois à pH 3,8	à l'ori- gine.	apr. 5 Mois au pH du vin	apr. 5 mois à pH 3,8
1	I2°I	3,30	0,23	0,55	0,55	620	360	I65
2	I0°7	3,00	0,34	0,52	0,60	435	I7	8
3	I2°8	3,15	0,29	0,42	0,49	750	440	400
4	I2°6	3,05	0,43	0,48	0,60	470	230	25
5	II°7	3,25	0,27	0,39	0,52	780	290	I60
6	I2°I	3,60	0,30	0,58	0,60	850	35	35
7	I2°8	3,20	0,27	0,49	0,53	500	30	35
8	I2°2	3,20	0,21	0,48	0,55	400	400	I6

Acidité volatile en g /l. Mésoinositol en mg /l (méthode microbiologique.)

Dans ce tableau, les chiffres montrent une disparition du mésoinositol sans augmentation importante de l'acidité volatile.

L'énergie indispensable au développement bactérien peut provenir

de la décomposition de substances azotées; des baisses d'azote albuminoïde ont été enregistrées.cf LUTHI (56).

A notre avis, les acides aminés, ou certains acides aminés plus précisément, jouent un rôle important sur le plan de l'apport énergétique, notre étude en est d'ailleurs une preuve.

§ 4. Caractères communs aux germes.

Depuis le compte rendu de BIDAN (84), des isollements de nouvelles bactéries ont eu lieu; les caractères précis de ces dernières n'ont pas figuré en grand nombre, à notre connaissance, dans la bibliographie mondiale.

BARRE et GALZY (98) ont isolé en 1960 une nouvelle bactérie qui a une propriété distinctive, celle d'être pigmentée; ce n'est pas la première, puisque les auteurs nous apprennent que BREED et PEDERSON (99) avaient cité une variété pigmentée de L.brevis. La bactérie de BARRE et GALZY correspond en de nombreux points au tableau de BIDAN sur les caractères communs puisqu'elle est Gram +, qu'elle ne possède pas de cils, qu'elle n'est pas mobile, qu'elle ne forme pas d'indol, de SH_2 , ni de nitrites à partir des nitrates, ni d'acétylméthylcarbinol; pour la catalase son test est négatif.

Quelques années après, BARRE et GALZY (100) découvrent dans un vin, un lactobacille homofermentatif. De bien des façons ce microbe est en accord avec le tableau de BIDAN, la différence étant la production d'acétylméthylcarbinol.

Les caractères communs aux germes malolactiques que nous connaissons peuvent donc se résumer ainsi:

Produit principal à partir des sucres.....	acide lactique
Mobilité.....	non mobiles
Gram.....	positif
Catalase.....	négatif
Formation de nitrites à partir de nitrates.....	négative
Formation d'Indol.....	négative
Formation de SH_2	négative

L'ensemble de ces facteurs communs, fait préférer à PEYNAUD et S.DOMERCQ (101), les tests biochimiques principaux pour l'identification des bactéries malolactiques.

Ces tests visant les caractères distinctifs, sortent du cadre de ce paragraphe, nous allons en continuer l'étude dans le suivant.

§ 5. Différences entre les germes.

PEYNAUD et S.DOMERCQ (101) dans leur étude sur les bactéries lactiques s'expriment ainsi: « La différenciation des bactéries est basée sur des observations microscopiques de forme, de colorations, et sur l'étude des caractères physiologiques. Les tests de production d'acétoïne, d'indol, de réduction des nitrates et de la présence de catalase sont des essais classiques d'identification des bactéries, mais dans le cas des bactéries lactiques ils donnent des résultats négatifs pour les quatre genres *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* qui peuvent intéresser l'oenologie. Cette raison (également valable pour le cidre) a conduit CARR(66) à simplifier le processus d'identification des bactéries, en ne considérant que les tests biochimiques principaux: catalase, fermentation des sucres, fermentation des acides organiques, hétéro-ou homofermentation. L'examen microscopique permet de séparer les bactéries en deux catégories: coques (forme ronde) et bacilles (forme de bâtonnet). La détermination des caractères physiologiques permet d'identifier le genre et l'espèce. »

Les modes opératoires des premiers critères cités (acétoïne, indol, nitrates...) sont expliqués dans le Traité d'Oenologie de RIBEREAU-GAYON et PEYNAUD (12), ces derniers mentionnent en plus le test de CARR sur la température, assurant la croissance maximum; ils ajoutent que l'on pourrait également étudier le pH optimum de développement et la température mortelle des cellules.

Mais reprenons les travaux de PEYNAUD et S.DOMERCQ (101) pour nous arrêter sur leur crible de l'hétéro-ou homofermentation. Leurs cultures ont été effectuées avec du moût de raisins acides dilué deux fois et additionné de 5 g./Litre d'extrait de levures, pour enrichir le milieu en facteurs

de croissance et en oligoéléments. Le milieu est partagé et ajusté à divers pH, 3,00; 3,20; 3,40; 3,60; 3,80; 4,00 et 4,20. Ils le laissent plusieurs semaines à 25°C, puis ils dosent dans chaque cas, l'acidité volatile formée, le sucre fermenté et évaluent par chromatographie l'acide malique restant. Nous reproduisons ci-dessous leur tableau:

CARACTERES FERMENTATIFS DES BACTERIES EN FONCTION DU pH. selon PEYNAUD et S.DOMERCQ (Tableau XXVIII)							
	N° des souches		pH 3,00	pH 3,20	pH 3,40	pH 3,60	pH 4,00
Bacille homofermen- tatif.	7	Sucre fermenté	4,00	3,00	6,00	6,00	12,00
		Acide malique restant	2,00	2,00	0,00	0,00	0,00
		Acidité volatile	0,20	0,20	0,20	0,30	0,30
Bacilles hétéro- fermentatifs	21	Sucre fermenté	5,00	6,00	8,00	9,00	45,00
		Acide malique restant	2,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		Acidité volatile	0,23	0,28	0,28	0,36	3,90
	1	Sucre fermenté	0,00	0,00	4,00	34,00	57,00
		Acide malique restant	3,00	3,00	3,00	1,50	0,00
		Acidité volatile	0,20	0,30	0,60	4,10	7,20
	4	Sucre fermenté	0,00	40,00	52,00	50,00	55,00
		Acide malique restant	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		Acidité volatile	0,35	4,70	5,70	6,10	7,10
Coques hétéro- fermentatifs	18	Sucre fermenté	6,00	6,00	9,00	10,00	28,00
		Acide malique restant	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		Acidité volatile	0,30	0,31	0,31	0,32	2,20
	5	Sucre fermenté	0,00	6,00	11,00	23,00	43,00
		Acide malique restant	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		Acidité volatile	0,35	1,20	1,70	3,35	5,30

Par ce système de triage, les auteurs peuvent caractériser l'aptitude des bactéries à produire une fermentation malolactique, par deux chiffres: l'un représentant le pH-seuil d'attaque de l'acide malique, l'autre le pH-seuil d'attaque des sucres avec production élevée d'acidité volatile. «Plus l'écart est grand entre ces deux valeurs de pH, et mieux la bactérie est adaptée à la fermentation malolactique dans les vins.»

La classification générale des bactéries malolactiques est encore confuse, RIBEREAU-GAYON et PEYNAUD (12) donnent les deux classements existant actuellement: celui du Bergey's manual (103) et celui de PREVOT (104), nous les exposons dans les lignes suivantes:

CLASSIFICATION DES BACTERIES DU VIN.			
Dans le cadre de la classification du Bergey's manual (I03)			
Extrait de RIBEREAU-GAYON et PEYNAUD (I2) (Tableau ~~XXIX~~)			
Classe des SCHIZOMYCETES.			
ORDRE	FAMILLE	TRIBU	GENRE
10 ordres dont Pseudomonadales	7 familles dont Pseudomonadaceae		I2 genres dont Acétobacter"
Eubacteriales	I3 familles dont Lactobacillaceae	Streptococceae —	{ Diplococcus Streptococcus" Pediococcus" Leuconostoc" Peptostreptococcus
		Lactobacilleae —	{ Lactobacillus" Eubacterium Catenabacterium Ramibacterium Cillobacterium

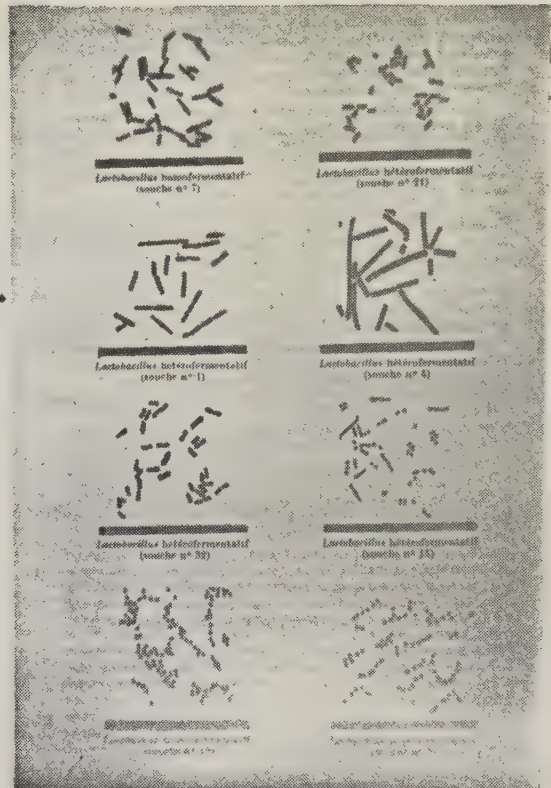
CLASSIFICATION DES BACTERIES DU VIN.			
Dans le cadre de la classification de PREVOT (I04)			
Extrait de RIBEREAU-GAYON et PEYNAUD (I2) (Tableau XXX)			
Classe des EUBACTERIALES asporulées.			
ORDRE	FAMILLE	TRIBU	GENRE
Micrococcales (forme sphérique)	Neisseriaceae Micrococcaceae	Streptococceae — Staphylococceae Micrococceae	{ Diplococcus Streptococcus Leuconostoc"
Bacterales (batonnets cylindriques)	Parvobacteriaceae Ristellaceae Enterobacteriaceae Pseudomonadaceae Bacteriaceae — Protobacteriaceae	5 tribus dont Acetobacterieae —	{ 8 genres dont Lactobacillus" Acetobacter"
Spirallales (formes in- curvées et spirales.)			

N.B. Les genres rencontrés dans le vin, possèdent un signe distinctif."

L'Ecole de Bordeaux (I2) a commencé une série d'isolements de souches malolactiques. Actuellement 29 souches sont identifiées, elles sont isolées de vins jeunes en cours de fermentation malolactique, ou ayant subi une altération bactérienne.

Fig. 3

(extraite du Traité d'Oenologie RIBEREAU-GAYON et PEYNAUD. 1961 autorisation des auteurs.) (I2)



Ces 29 souches se répartissent comme suit:

- 1 souche constituée de bacilles homofermentatifs genre Lactobacillus.
- 16 d?..... hétérofermentatifs et pouvant appartenir aux espèces Lactobacillus pastorianus, Lactobacillus brevis, Lactobacillus hilgardii.
- 12 d?..... coques hétérofermentatifs appartenant au genre Leuconostoc.

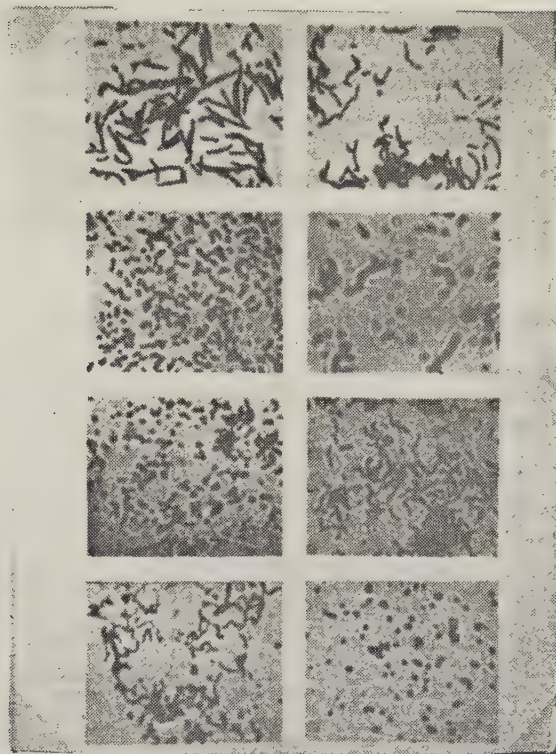
Les chercheurs n'ont pas rencontré de coques homofermentatifs appartenant au genre Pediococcus.

La figure 3, donne quelques dessins des formes typiques rencontrées au cours des isollements.

Les exigences de croissance pour ce genre de microorganismes, n'ont pas permis de faire le classement distinctif pour le genre Lactobacillus entre Lactobacillus plantarum et Lactobacillus delbrueckii.

Les observations microscopiques faites au grossissement de 1500, sont représentées figure 4.

Fig. 4



(extraite du Traité d'
Oenologie. RIBEREAU-
GAYON et PEYNAUD. 1961.
autorisation des auteurs)
(I2)

Bactéries lactiques isolées de vins.
Observations de RIBEREAU-GAYON et PEYNAUD (I2)
après fixation et coloration selon GRAM (x 1500)

L	A	B
<u>Lactobacillus</u> homofermentatif	<u>Lactobacillus</u> hétérofermentatifs	
(souche N° 7)	(souche N° 21)	
C	D	
<u>Lactobacillus</u> plantarum (Lambion)	<u>Lactobacillus</u> hétérofermentatif	
	(souche N° 1)	
E	F	
<u>Lactobacillus</u> hétérofermentatif	<u>Leuconostoc</u> hétérofermentatif	
(souche N° 14)	(souche N° 18)	
G	H	
<u>Leuconostoc</u> hétérofermentatif	<u>Leuconostoc</u> mesenteroides	
(souche N° 5)		

En dehors de la France, RADLER (IO5) en 1962, souligne qu'une classification systématique, propre aux bactéries du vin ou tout au moins tenant compte de celles-ci serait souhaitable et que jusqu'à maintenant les rangements sont axés en majorité sur la microbiologie générale. L'auteur semble en accord avec le Bergey's manual. Les difficultés, dit-il, proviennent aussi du choix du milieu nutritif, qui est déterminant pour le résultat.

La Station Agronomique de Bordeaux, PEYNAUD, S. DOMERCQ et GUIMBERTEAU (I06) lors d'une intervention au Symposium International d' Oenologie de Juin 1963 (I07) a fait connaitre le stade actuel de ses recherches: 300 souches de bacteries sont à l'étude, 150 dont les travaux sont plus avancés ont permis un rangement provisoire, et parmi elles 10 seulement (sur 150) sont homofermentatives. On peut distinguer:



Les essais concernant les besoins en facteurs de croissance, les pH seuils, l'influence de l'aération, de l'alcool, et le métabolisme de l'azote sont en cours. PEYNAUD, S. DOMERCQ et GUIMBERTEAU (I06) signalent qu'il y aurait lieu de tenir compte de tests nouveaux étudiant la formation de polyalcools à partir du glucose, arabinol, érythritol, glycérol, mannitol.

Ces travaux sont commencés depuis trois ans.

Le rapport yougoslave de MILISAVLJEVIC (108) présenté à l'O.I.V en Commission II "Oenologie" (4ème réunion, Israël 15-17 Juillet 1963), nous apporte une critique des classifications actuelles. Nous reproduisons son tableau comparatif entre, Bergey's manual (103), PREVOT (104), KRASSILNIKOV (109) et TESIC (110) (111).

TABLEAU COMPARATIF des CLASSIFICATIONS de bacteries malolactiques. Selon MILISAVLJEVIC (108) (Tableau XXXI)			
(103).a) Bergey's manual (classe des Schizomycètes)			
Ordre	Famille	Tribu	Genre
Eubacteriales	Lactobacillaceae	Streptococceae	Streptococcus Pediococcus Leuconostoc
		Lactobacilleae	Lactobacillus
(104).b) PREVOT (classe des Eubacteriales asporulées)			
Ordre	Famille	Tribu	Genre
Micrococcales	Micrococcaceae	Streptococceae	Streptococcus Leuconostoc
Bacteriales	Bacteriaceae		Lactobacillus
(109).c) KRASSILNIKOV (classe des Actinomycètes)			
Ordre	Famille	Tribu	Genre
Coccaceae	Coccaceae		Streptococcus
Mycobacteriales	Mycobacteriaceae		Lactobacterium
(110) (111).d) TESIC (classe des Schizomycètes)			
Ordre	Famille	Tribu	Genre
Eubacteriales	Coccaceae		Streptococcus
	Mycobacteriaceae		Lactobacterium

MILISAVLJEVIC avec HOCHSTRASSER (112) propose de classer toutes les formes coccoïdes en Streptococcus malolacticus, avec une distinction pour celles qui provoquent la maladie de la graisse Streptococcus malolacticus var. mucilagenosus. Pour les bâtonnets, il propose 3 espèces seulement:

Lactobacterium gracile, décomposant énergiquement l'acide malique;
Lactobacterium mannitolpoeum, production de manite accentuée;
Lactobacterium tartarophthorum, capable de décomposer l'acide tartrique.

Après cette étude yougoslave, concluons ce paragraphe par le rapport italien de FLORENZANO et VERONA (113) à la même commission de l'O.I.V, sur les méthodes d'isolement, de culture et de classification des bactéries malolactiques. Les chercheurs italiens s'expriment ainsi: «Les problèmes liés à l'isolement des bactéries malolactiques ont leur origine, en grande partie, dans deux données qui sont d'une part, la relative minorité numérique des malolactiques à l'égard des autres groupes microbiens, et d'autre part, leurs grandes exigences de nutrition.» Ces lignes montrent bien toutes les difficultés éprouvées par les biologistes pour le rangement de ces microorganismes. Espérons que l'Ecole de Bordeaux apporte enfin une nomenclature classée de ces microbes.

§ 6. Facteurs agissant sur les bactéries malolactiques.

1) Facteurs biologiques.

a- ACTIVATEURS

Depuis ces derniers temps, les auteurs sont assez nombreux, à notre connaissance, pour admettre que la levure consomme des facteurs de croissance, qui profiteraient aux bactéries, et qu'elle leur restitue ensuite par autolyse. RADLER (114) dans une publication attribue une importance à ces facteurs, puisqu'il ne cite que ces derniers comme éléments biologiques ayant une influence. Dans le même ordre d'idées, FORNACHON (115) souligne que le séjour sur lies, par libération de facteurs et d'acides aminés, est bénéfique pour la rétrogradation; c'est aussi l'avis de SILVA BABO (116) .

HUSFELD (3) rapporteur général à la Commission II de l'O.I.V confirme que des constatations sont concordantes chez bien des chercheurs pour accorder aux levures à croissance rapide, un effet inhibiteur momentané, compensé ensuite par libération autolytique de substances. Dans le rapport de son pays, HUSFELD (91) s'exprime ainsi : « D'une part, les levures gênent le développement des bactéries aussi bien par la formation d'alcool que par l'élimina-

tion de substances nutritives et de substances de croissance. D'autre part, vers la fin de fermentation,elles fournissent,en particulier par autolyse, des acides aminés et des vitamines». Enfin FEDUCHY MARINO (118) et VIANA MARQUES GOMEZ,FEREIRA DA SILVA BABO (119) voient aussi dans les lies un apport d'éléments nutritifs.

MILISAVLJEVIC (108) a réalisé en 1963 des essais avec des lies de la façon suivante;pour prouver leur influence. Après fermentation alcoolique le dépôt formé a été remis en suspension,puis le vin a été partagé en 2, une partie (appelée K par l'auteur) a été mise en bouteilles avec sa lie, l'autre (C) a été mise en bouteilles après clarification par centrifugation, donc sans lie. Nous reproduisons ci dessous ses résultats.

ACTION DES GROSSES LIES DE VIN SUR LA FERMENTATION MALOLACTIQUE. selon MILISAVLJEVIC (Tableau XXXII)				
Cépages	Mode de vinification.	Commencement de la fermentation alcoolique.	Disparition de l'acide malique	
			(K)	(C)
Pinot	Rouge	12 IX 1959	3 XII 1959	3 XII 1959
Prokupac	Rouge	12 IX 1959	12 V 1960	12 V 1960
Slankamenka	Blanc	11 X 1960	23 XI 1960	23 XI 1960
Dinka	Blanc	11 X 1960	27 XII 1960	27 XII 1960
Pinot	Rouge	20 IX 1961	6 IV 1962	4 XII 1961
Slankamenka	Blanc	31 X 1962	22 XII 1962	22 XII 1962
Dinka	Blanc	31 X 1962	22 XII 1962	22 XII 1962

Dans sa conclusion,MILISAVLJEVIC,ne trouve aucune influence de la part des lies.

PEYNAUD et DUPUY (120) pensent, à notre avis avec juste raison, que «les levures peuvent agir par épuisement de certains éléments essentiels ou par production de substances inhibitrices».

Toutes les références que nous venons de citer dans ce paragraphe 6,sont récentes puisque la plus ancienne,RADLER (114) est de 1963; depuis le début de nos travaux (1959),nous avons toujours pensé que les rapports levures-bactéries étaient importants,et dans le double sens donné par PEYNAUD et DUPUY (120).

Mais en dehors du pouvoir séquestrant ou inhibiteur de la levure, le jus de raisin possède des facteurs naturels ayant certainement une action sur les bactéries,notre étude sur le pressurage en donne un exemple détaillé.

On peut remarquer dans l'étude de CHAUVET, BRECHOT, DUPUY, CROSSON, et IRRMANN (121) sur la macération carbonique, que le déclenchement malolactique se fait après le pressurage, sans que les auteurs l'expliquent puisque tel n'était pas leur but; nous pensons que certains facteurs sont localisés dans une catégorie de cellules végétales écrasées seulement au serrage et que ces corps ne sont pas présents dans le jus de goutte.

b- INHIBITEURS.

Les essais de MILISAVLJEVIC commencés en 1958 (76) se sont poursuivis, et à la Commission II de l'O.I.V, il a donné (108) la suite de ses travaux sur la race de la levure et son influence vis à vis des bactéries ; son tableau se complète comme suit:

ACTION DE LA RACE DE LA LEVURE SUR LA FERMENTATION MALOLACTIQUE. selon MILISAVLJEVIC (108). (Tableau XXXIII)		
Vendange	Race de la levure	Disparition de l'acide malique après. (jours)
1958	S.4	plus de 300
	25 C	48
1960	S.4	plus de 319
	25 C	42

Incontestablement il y a antagonisme entre Saccharomycès S.4 et les bactéries malolactiques, est-ce par action antibiotique ?

Plusieurs chercheurs ont mis en évidence une action antibiotique, par exemple KOCH (122) dans la bière a montré des zones d'inhibition sur culture en plaques, provoquées par des développements de levures hautes et basses vis à vis de Bacillus subtilis et Bacterium prodigiosum. On peut se demander pourquoi n'en serait-il pas de même pour certaines levures de vin

envers les bacteries malolactiques.

COOK, KREKE, GIERSCHE et SCHROEDER (123) ont extrait de la levure par un solvant organique une substance non volatile, soluble dans l'eau, et stable à 100°C à pH 7, et ayant un pouvoir bacteriostatique sur Escherichia coli et sur Staphylococcus aureus. D'une manière plus orientée vers les bacteries malolactiques, nous trouvons les observations de FLESCHE et JERCHEL (124). Certaines levures peuvent avoir, disent-ils, une influence inhibitrice marquée, sans pouvoir démontrer si il s'agit d'une substance bacteriostatique ou bactericide élaborée par ces premières. RIBEREAU-GAYON et PEYNAUD (12) ont présenté une étude comparative de certaines races de levures vis à vis de Leuconostoc et Lactobacillus; nous reproduisons leurs résultats.

INFLUENCE DE L'ESPECE DE LEVURES SUR LA FERMENTATION MALOLACTIQUE. Selon RIBEREAU-GAYON et PEYNAUD (12) (Tableau XXXIV)		
Espèce de levure ayant assuré la fermentation alcoolique	Vinensemencé avec	
	<u>Leuconostoc</u>	<u>Lactobacillus</u>
<u>Saccharomycès ellipsoideus</u>	0	0
..... <u>chavalieri</u>	0	0
..... <u>carlsbergensis</u>	0	0
..... <u>uvarum</u>	0	0
..... <u>acidifaciens</u>	0	0
..... <u>heterogenicus</u>	0	0
..... <u>fructuum</u>	1,4	0
..... <u>bayanus</u>	1,8	0
..... <u>elegans</u>	1,9	0
..... <u>oviformis</u>	2,3	0
<u>Saccharomycodes ludwigii</u>	1,6	1,7
<u>Saccharomycès rouxii</u>	2,2	2,3
..... <u>veronae</u>	2,3	2,4
..... <u>italicus</u>	2,6	2,5
..... <u>florentinus</u>	2,7	2,3
Perte d'acidité totale en g/l . H ₂ SO ₄ , en 50 jours après l'ensemencement par des bacteries malolactiques à la température de 25°C.		

Les expériences résumées dans le tableau ci-dessus ont été conduites de la façon suivante. On ensemence avec une série de levures différentes un moût de raisin stérile (11°4 Baumé. pH 3,25. 5,59 g/l d'acidité totale; et une teneur en acide malique de 5,5 g/l.). Après fermentation complète (dans le cas de levures peu alcoologènes, la fermentation était achevée par Saccharomycès ellipsoideus), les levures sont éliminées par filtration. Le vin limpide obtenu est ensemencé, une partie avec une suspension de bacteries malolactiques cultivées du genre Leuconostoc, et une autre partie avec une suspension de

bacteries genre Lactobacillus. Au bout de 50 jours l'acidité restante est titrée. Le tableau ci dessus représente donc la perte d'acidité totale, on peut d'ailleurs constater que la fermentation malolactique n'a pas été possible, pendant ce délai, avec le milieu fermenté par les 6 premières espèces de levures.

2) Facteurs biochimiques et chimiques.

Cette seconde partie du paragraphe 6 est la plus importante et aussi la plus complexe. Nous verrons en premier lieu les facteurs que l'on peut classer comme ayant une influence favorisante sur le déclenchement malolactique, puis ceux dont l'effet est inverse et enfin les éléments discutés: vitamines, acides aminés...e.t.c.

a - FACTEURS QUE L'ON PEUT CLASSER COMME AGISSANT FAVORABLEMENT.

Le déclenchement malolactique est de plus en plus fréquent dans la région du Muscadet et il nous semblerait que l'accumulation des produits fongicides sur la vigne y joue un rôle. CASSIGNARD (125) a montré que les levures sont en nombre moins important sur les vignes ayant reçu un grand nombre de traitements fongicides ou insecticides. Comme il n'est pas impossible que les bacteries soient plus résistantes à ces produits, ou tout au moins leur prolifération plus rapide sur les raisins, la numération bactérienne du moût risque d'être plus importante que la numération levurienne.

Le gaz carbonique, loin d'être un inhibiteur de la fermentation malolactique, est regardé comme facteur favorisant sous bien des signatures. PEYNAUD et DUPUY (120) lui reconnaissent un rôle stimulant mais qui ne peut encore s'appliquer à toutes les bacteries et à tous les milieux. Dans la bière, HARRIS et WATSON (126) ont fait connaître que la croissance de Lactobacilli d'infection, n'est possible au pH limite, qu'en présence de CO₂.

Si l'on regarde les essais de vinification en macération carbo-

nique de BENARD et JOURET (127) on peut vraisemblablement déduire que le CO_2 a une action excitante, puisque les vins de macération carbonique subissent toujours une fermentation malolactique très tôt, par rapport aux autres vins vinifiés différemment.

Dans un autre ordre d'idées, FLESCH et JERCHER (124) ont constaté que les "saponines" favorisent le développement des bactéries lactiques dans le vin. Nous savons que les saponines ou saponosides sont des glucosides végétaux dont les solutions aqueuses moussent par agitation; elles sont douées de propriétés émulsionnantes. Les mêmes auteurs (124) attribuent au glucose un effet positif pour l'apparition de l'acide lactique. Ils sont en accord avec MELAMED (128). Ce dernier, en parlant d'un vin de l'Aude et d'un vin de Beaujolais sur lesquels ont porté ses expériences, s'exprime ainsi: « L'examen détaillé des sucres de ces deux vins, montre en outre qu'après la fermentation malolactique il a disparu plus de glucose que de fructose. La teneur en xylose est pratiquement inchangée ».

RADLER (129) en confirmation de LUTHI et VETSCH (80) voit dans les peptides une source d'activité des microorganismes lactiques, en plus des acides aminés, des sucres et des vitamines.

Enfin pour terminer ces lignes sur les facteurs agissant favorablement, notons que récemment PEYNAUD et DUPUY (120) ont mis en évidence que l'apport de réducteurs (cystéine, acide ascorbique) dans le vin, augmentait le développement bactérien. Ils formulent cette réserve toutefois; la cystéine ajoutée au moût, se montre nettement inhibitrice, donc cet élément n'agit pas directement, mais réduit d'autres corps du milieu de culture.

b - FACTEURS DEFAVORABLES A LA FERMENTATION MALOLACTIQUE.

Le tanin.

Dans les travaux de BENARD et JOURET (127) que nous avons cités précédemment, on peut observer que le déclenchement malolactique ne se fait pas dans le lot de raisins entiers foulés: « La richesse en tanin des raisins entiers », disent-ils, « joue peut-être un rôle inhibiteur pour les bactéries lactiques ». C'est le même diagnostic envers le tanin, que nous trouvons dans le bulletin d'information du Ministère de l'Agriculture (130): « Tous ces microorganismes voient leur croissance et leur activité facilitées par une faible acidité et une faible teneur en substances tanniques ». Cet article du bulletin était intitulé: Actions bactériennes dans les vins.

RADLER (114) est aussi très catégorique envers les tanins, ainsi

que HUSFELD (91) et l'Ecole de Bordeaux; S. DOMERCQ, SUDRAUD et CASSIGNARD (88).

Cette façon de considérer les tanins comme inhibiteurs des bactéries lactiques n'est pas surprenante puisque déjà, pour d'autres bactéries il est vrai, NEGRE (131)(132) et LABORDE (133) leur avait reconnu un pouvoir bactericide.

Le cuivre.

Il est intéressant de noter au passage que RIBEREAU-GAYON (134), mentionne que quelques milligrammes par litre de cuivre, s'opposent aux fermentations lactiques dans les vins.

c - LES VITAMINES

Nous avons pu constater dans le tableau synoptique, que les avis ne sont pas uniformes pour chaque vitamine. D'une manière générale RADLER (129) estime que les vitamines ont un rôle dans la dégradation de l'acide malique. Pour BANHIDI (135) la thiamine est un activateur important envers Lactobacillus fermenti; ce même auteur dans une autre publication (BANHIDI. (136) précise que pour 4 souches de Lactobacillus büchneri et 5 souches de Lactobacillus brevis, il y a exigence tantôt en riboflavine, tantôt en thiamine, tantôt dans les deux, mais de toute façon l'une ne peut remplacer l'autre. En ce qui concerne la riboflavine on trouve un avis analogue avec PEYNAUD (137) qui a doublé les doses de certaines vitamines par rapport à leur teneur naturelle dans les vins. Ses essais portaient sur: thiamine, acide pantothénique, acide nicotinique, pyridoxine, biotine et mésoinositol, seuls ou associés; et il a noté une accélération très nette de la fermentation de l'acide malique par l'augmentation de ces éléments, mais c'est surtout la riboflavine ou vitamine B₂ qui répondait le mieux à ses tests. Un autre chercheur, MAR MONUX (138), reconnaît aussi à la riboflavine son effet important, avec également l'acide pantothénique.

Opérant dans des conditions synthétiques, DU PLESSIS (139), a montré que l'acide nicotinique, la riboflavine, le pantothénate de calcium, et enfin soit la thiamine ou la pyridoxine; étaient indispensables aux bactéries lactiques.

Concluons en indiquant que la majorité des oenologues microbiologistes affirme que l'addition de vitamines du complexe B, est bénéfique

pour la décomposition de l'acide malique, comme le mentionnaient VIANA MARQUES GOMEZ et FERREIRA DA SILVA BABO (119).

d - LES AMINOACIDES.

Au début de ce sous-paragraphe réservé aux acides aminés, reproduisons le tableau de S.LAFON (140) sur la composition azotée des bactéries des espèces Leuconostoc et Lactobacillus.

COMPOSITION AZOTEE DES BACTERIES LACTIQUES selon S.LAFON.
(isolées de vins et développées
sur jus de raisin enrichi. N total 756mgL (Tableau XXXV)

% du poids de protides.

α-Alanine.....	3,2
Arginine.....	II,6
Acide aspartique.....	5,0
Cystine.....	0,2
Acide glutamique.....	IO,3
Glycocolle.....	4,8
Histidine.....	I,2
Isoleucine.....	6,0
Leucine.....	5,3
Lysine.....	II,8
Méthionine.....	2,2
Phénylalanine.....	2,3
Proline.....	2,4
Sérine.....	4,6
Thréonine.....	4,6
Tryptophane.....	0,6
Tyrosine.....	3,9
Valine.....	6,0

Comme le conseillent PEYNAUD et S.DOMERCQ (101) dans leur étude , il est d'un grand intérêt de comparer cette composition avec celle des levures.

Dans le tableau suivant nous allons donc exposer les chiffres de BLOCK et BOLLING (141) qui représentent la constitution moyenne en acides aminés des protides de levures.

COMPOSITION AZOTEE DES LEVURES selon BLOCK et BOLLING (141)
(Tableau XXXVI)

% du poids de protides

Arginine.....	4,7
Histidine.....	2,6
Lysine.....	7,3
Tyrosine.....	4,4
Tryptophane.....	1,4
Phénylalanine.....	3,5
Cystine.....	1,2
Méthionine.....	1,5
Sérine.....	5,0
Thréonine.....	5,5
Leucine.....	6,3
Isoleucine.....	4,8
Valine.....	5,7
Glutamine.....	10,8
Asparagine.....	7,9
Glycocolle.....	4,1
Alanine.....	6,1
Proline.....	4,2

Nous allons maintenant comparer en un seul tableau les compositions de levures et de bactéries.

TABLEAU COMPARATIF DE LA COMPOSITION AZOTEE DES LEVURES ET DES BACTERIES.

(Tableau XXXVII) Aminoacides.	% du poids de protides	
	BACTERIES lactiques (selon S. IAFON)	LEVURES (selon BLOCK et BOLLING)
Alanine.....	3,2	6,1
Arginine.....	11,6	4,7
Acide aspartique.....	5,0	
Cystine.....	0,2	1,2
Acide glutamique.....	10,3	10,8. (glutamine)
Glycocolle.....	4,8	4,1
Histidine.....	1,2	2,6
Isoleucine.....	6,0	4,8
Leucine.....	5,3	6,3
Lysine.....	12,8	7,3
Méthionine.....	2,2	1,5
Phénylalanine.....	2,3	3,5
Proline.....	2,4	4,2
Sérine.....	4,6	5,0
Thréonine.....	4,6	5,5
Tryptophane.....	0,6	1,4
Tyrosine.....	3,9	4,4
Valine.....	6,0	5,7
Asparagine.....		7,9

L'examen du tableau général de comparaison (T.XXXVII), fait ressortir des différences sensibles pour certains éléments; PEYNAUD et S.DOMERCQ (101) le soulignent dans leur travail. Les bacteries lactiques sont beaucoup plus riches en arginine et lysine que les levures, et un peu plus pauvres en alanine, acide aspartique et proline.

Ces mêmes auteurs (101), en approfondissant la nutrition azotée des bactéries lactiques, nous fournissent deux tableaux intéressants: le premier (T.XXXVIII) met en relief l'évolution des aminoacides en fonction du déclenchement malolactique dans les vins; le second (XXXIX) traite de la modification du taux des aminoacides dans un milieu de culture attaqué par les microorganismes lactiques.

MODIFICATION DE LA COMPOSITION AZOTEE DES VINS PAR FERMENTATION MALOLACTIQUE				
Teneurs en mgr/L. Analyses de S.LAFON-LAFOURCADE.				
(tableau extrait de PEYNAUD et S.DOMERCQ) (Tableau XXXVIII)				
	Vin rouge		Vin blanc	
	Avant fermentation malolactique	Après fermentation malolactique	Avant fermentation malolactique	Après fermentation malolactique
Alanine	9	0	-	-
Arginine.....	24	14	58	14
Cystine.....	2	3	-	-
Acide glutamique.....	34	71	34	47
Isoleucine.....	12	27	16	18
Leucine.....	6,6	37	18	21
Thréonine.....	19	100	258	200
Tryptophane.....	3,7	24	5,2	18
Valine.....	26	38	30	38
AZOTE ammoniacal.....	7	28	3	17

Certains acides aminés ont leur teneur augmentée par protéolyse de polypeptides ou de proteines, d'autres sont toujours consommés comme l'arginine. La thréonine se comporte différemment d'un vin à un autre.

MODIFICATION DE LA COMPOSITION AZOTÉE D'UN MILIEU DE CULTURE PAR LES BACTERIES LACTIQUES.

Milieu: moût de raisin dilué, enrichi à l'extrait de levure et ajusté pH 4,2

Teneurs en mgr/L. Analyses de S.LAFON-LAFOURCADE.

(tableau extrait de PEYNAUD et DOMERCQ)(101)

(Tableau XXXIX)

	Avant fermentation	Fermenté par <u>Leuconostoc</u>	Fermenté par <u>Lactobacillus</u>
Alanine	88	110	110
Arginine	150	41	41
Acide aspartique.....	110	20	19
Cystine.....	5	3	3
Acide glutamique.....	194	71	73
Glycocolle.....	102	36	35
Histidine.....	20	9	9
Isoleucine.....	130	29	35
Leucine.....	155	46	62
Lysine.....	63	0	0
Méthionine.....	45	16	16
Phénylalanine.....	120	56	32
Proline.....	205	148	148
Sérine.....	124	92	92
Thréonine.....	275	130	130
Tryptophane.....	8	4	4
Tyrosine.....	106	35	29
Valine.....	132	40	47
Azote total.....	756	621	627
Azote ammoniacal.....	87	78	78

Dans ces deux derniers tableaux, l'arginine est toujours consommée. Cette remarque est en accord avec le tableau de composition des bactéries où cet acide aminé entre pour une large part. A notre avis, l'arginine est le plus important des aminoacides pour le déclenchement malolactique. CARLES, M. LAMAZOU-BETBEDER et R. PECH (142) classent l'arginine comme aliment azoté de prédilection des actions bactériennes.

Ces études que nous venons de passer en revue, suffisent pour

prouver la grande part des acides aminés dans la nutrition des bactéries lactiques.

DU PLESSIS (139), dans la même optique, nomme 5 aminoacides essentiels au développement lactique: l'acide glutamique, la valine, l'arginine, la leucine et l'isoleucine. FLORENZANO et VERONA (113) reconnaissent eux-aussi l'influence importante de ces éléments. Ils constatent une variabilité de consommation d'une souche à l'autre, mais estiment nécessaires les éléments azotés suivants: arginine, cystine, acide glutamique, histidine, lysine, serine, phenylalanine, tryptophane, tyrosine et valine. Certaines bases azotées comme: adénine, guanine, xantine, uracil, ont aussi leur efficacité pour ces auteurs, leur absence; disent-ils; fait décroître la prolifération de 20%.

e - FACTEURS DIVERS (ou dont l'influence n'est pas absolument déterminée.)

Le SO₂

La position de l'anhydride sulfureux dans cette catégorie des facteurs dont l'influence est discutable, s'est justifiée ici. Il n'est pas possible de classer ce composé strictement comme inhibiteur, puisque certains auteurs, en minorité sans doute, ont observé un déclenchement malolactique malgré une addition de cet élément. Par exemple, RIBEREAU-GAYON et PEYNAUD (12) au cours de leur vinification expérimentale de blanc en 1960, s'expriment ainsi :«On a constaté dans cet essai que l'acide sulfureux ajouté avant fermentation, tout en retardant fortement la fermentation malolactique, ne l'a pas finalement empêchée, et que les additions de vitamine B₂ ou de mycélium ne l'ont pas favorisée, ni l'addition de sucre en fin de fermentation alcoolique. La remarque sans doute la plus intéressante a été que la fermentation malolactique s'est déroulée plus rapidement à température normale qu'à 30°C.»

En énumérant les facteurs de la fermentation malolactique au cours du Symposium de Bordeaux (107), SILVA BABO (116) résume ses observations et plus particulièrement celle adressée au SO₂, comme suit :«.....nous avons remarqué que la fermentation malolactique s'est effectuée dans quelques essais même avec l'application de 100 mgr/L de SO₂ avant la fermentation alcoolique.»

Le Phosphate d'ammoniaque.

Le phosphate d'ammoniaque répondant très bien sur la levure, ne donne pas les mêmes résultats sur la flore bactérienne lactique, le même auteur (116) précise que l'addition d'ammonium comme facteur unique ne présente qu'un intérêt réduit, mais que si cet apport est accompagné d'une correction de pH, l'influence est favorable.

Dans cette dernière association de facteurs (phosphate d'ammoniaque et correction du pH), à notre avis, c'est la modification de concentration en ions hydrogène qui commande ce mécanisme pour la plus grande part.

L'alcool.

Ce facteur est en général reconnu comme inhibiteur, cependant KONDO et FADENKO (143) discutent ses propriétés vis à vis des bactéries lactiques, puisqu'ils reconnaissent que ces dernières sont actives même en présence de 16° à 16°5 d'alcool (%Vol)

Influence du Lysozyme.

On ne peut terminer cette étude de facteurs, sans mentionner le lysozyme; c'est une substance naturelle cristallisée, provoquant à faible dose la lyse des bactéries, c'est à dire leur disparition par dissolution de leur paroi cellulaire. PEYNAUD et S.DOMERCQ (101) ont voulu vérifier cette action. Notons tout d'abord que c'est FLEMING(144) qui assistant à un collage de vin aux blancs d'oeufs, dans le Bordelais, eut l'idée que l'effet de cette vieille pratique oenologique, résidait dans l'action du lysozyme de blanc d'oeuf sur les bactéries. C'est lui d'ailleurs qui avait le premier isolé ce corps en dehors de la célèbre Pénicilline.

Les chercheurs Bordelais n'ont pas trouvé d'action du lysozyme sur les levures et les bactéries acétiques, mais par contre son pouvoir bactéricide est important sur les germes lactiques. Nous reproduisons les résultats de leurs travaux dans le tableau (XXXVIII). Les chiffres proviennent d'expériences faites avec du lysozyme cristallisé, mais avec les collages au blanc d'oeuf, même à doses élevées, les auteurs n'ont observé aucun

effet. C'est pourquoi ils pensent que le lysozyme du blanc d'oeuf n'est pas libéré dans le vin, mais précipité avec les albumines.

ACTION DU LYSOZYME SUR LES BACTERIES LACTIQUES DU VIN. selon PEYNAUD et S.DOMERCQ (101) (Tableau XXXX) Nombre de bacteries vivantes par cm ³ .					
Dose de lysozyme en mg/L	Vin rouge N°1 18.000.000		Vin rouge N°2 520.000		Vin blanc 20.000
	après 4.h	après 24 h	après 4 h	après 24 h	après 24 heures
4	2.600.000	2.300	490.000	12.000	30
8	1.430.000	2.250	200.000	8.000	10
12	19.700	1.750	4.200	2.400	40
16	15.800	2.000	4.700	2.700	10

3) Facteurs physiques.

Dans cette catégorie, le plus important de tous, est certainement celui qui conditionne la concentration en ions hydrogène: le pH. Cependant ce dernier, à lui seul, n'est pas déterminant; beaucoup de chercheurs sont de cet avis: CORDONNIER (145), SILVA BABO (116), VIANA MARQUES GOMEZ et FERREIRA DA SILVA BABO (119). Mais il reste non moins vrai qu'à partir de pH = 3,2 les conditions deviennent très favorables. (VILAR ROSA DA COSTA) (146) Pour mettre en valeur la grosse influence de ce paramètre physique, mentionnons la remarque de VILAR ROSA COSTA (146): «l'addition d'acide tartrique tendant à modifier de façon accentuée le pH, peut provoquer une action inhibitrice de la fermentation malolactique.»

Un autre terme intervient dans le phénomène malolactique, c'est le potentiel d'oxydo-réduction. CHARPENTIE (52) attribue un rôle favorable à l'oxygène; alors que S. DOMERCQ, SUDRAUD et CASSIGNARD (88) lui octroient un rôle inhibiteur.

Enfin pour terminer ce tour d'horizon rapide sur les facteurs physiques, indiquons une remarque des auteurs Bordelais (88) sur l'effet de la température. Ces derniers ont observé qu'un ralentissement du phénomène de dégradation biologique de l'acide malique se fait sentir aux températures 17°C et 33°C. D'ailleurs pour l'ensemble des chercheurs l'optimum se situe entre 21°C et 25°C.

§ 7. Répercussions de l'action des bactéries malolactiques sur le milieu.

Les bactéries malolactiques perturbent assez la composition azotée des vins; nous avons vu dans les lignes précédentes soit une consommation régulière d'acides aminés (Arginine), soit une attaque irrégulière de ceux-ci ou quelquefois même production. Mais l'azote proprement dit subit aussi des modifications; par exemple ARCHINARD et BOUDOT (53), BARAGIOLA et GODET (59bis) nous ont montré que l'azote albuminoïde diminuait au profit de l'azote ammoniacal.

Pour la production même de substances anormales, nous pouvons mentionner les travaux de RADLER (I47), (I48) sur la formation d'acétoïne et de diacétyl. Ses expériences portent sur l'évolution de Lactobacillus et de Leuconostoc dans un milieu synthétique et dans du jus de raisin et tomate. Les Lactobacillus produisent plus d'acétoïne et de diacétyl que les Leuconostoc. Nous savons que la production d'acides volatils et de mannite a été observée dans certains cas, c'est pourquoi le Bulletin d'Information du Ministère de l'Agriculture (93) préconise la prudence pour l'opportunité du déclenchement de la fermentation malolactique. Dans le cas où cette désacidification biologique se déclenche dans un vin en conservation et stabilisé vis à vis des levures avec l'acide sorbique, MAYER (I49) indique que les microorganismes lactiques produisent vraisemblablement en présence de ce fongicide, des substances indésirables.

2

A P E R Ç U D E S M O Y E N S

P O U R O B T E N I R L A

F E R M E N T A T I O N

M A L O L A C T I Q U E

Après cette historique des travaux réalisés jusqu'en 1959 et ensuite jusqu'à ce jour, nous allons dans les lignes qui vont suivre, faire état des moyens employés ou conseillés pour provoquer le déclenchement malolactique.

En Californie WEBB et INGRAHAM (150) obtiennent cette désacidification biologique par addition d'une culture pure de bactéries. FLESCHE et JERCHER (151) un peu dans le même ordre d'idées, nous font remarquer que des souches de Bactérium gracile résistent très bien à la lyophilisation, mais que si on ensemence un vin avec de tels microorganismes on n'obtient aucune activité. Il faut au préalable régénérer ces microbes dans un milieu nutritif. C'est par le dispositif de microscopie en fluorescence, que FLESCHE et JERCHER ont pu suivre la résistance des bactéries à la lyophilisation. En effet, par ce dernier artifice, les bactéries vivantes ont une fluorescence vert clair et les non vivantes une fluorescence rouge cuivrée. En Suisse FELL (152) obtient un meilleur déclenchement en ensemençant simultanément un moût avec des levures et des bactéries. FLESCHE (153) a pu obtenir des rétrogradations malolactiques avec des bactéries épuisées dans d'autres vins mais qui étaient régénérées dans un bouillon de culture. Là encore, par sa technique de microscopie en fluorescence, FLESCHE (154) a pu remarquer que dans certains cas des bactéries malolactiques ne se multipliant pas, pouvaient cependant attaquer l'acide malique; c'est ce qu'il appelle la fermentation malolactique obtenue par "bactéries non proliférantes".

Dans les études plus récentes, on trouve aussi des auteurs décrivant des procédés pour obtenir la désacidification biologique; citons en 1953 BEZZEGH (155). FELL (156) dans son rapport à l'Office International de la Vigne et du Vin sur les "Méthodes d'isolement de culture et de classification des bactéries malolactiques" constate de très bons résultats obtenus

par ensemencement avec des "levains" de bactéries; le chercheur Suisse a chiffré le nombre de jours écoulés entre l'ensemencement et la fin de fermentation malolactique, il obtient un gain de 40 à 60 jours en rapidité avec les lots ensemencés.

Un mode d'ensemencement tout à fait spécial nous est donné par BEZZEGH(I57). Il s'agit d'un procédé continu qui **consiste** à faire passer du vin sur une colonne gélosée contenant la culture bactérienne.

Très récemment, au cours de leurs essais d'ensemencement dans des moûts et des vins, KUNKE RALPH, OUGH et AMERINE (I58) ont obtenu une dégradation de l'acide malique plus rapide avec Leuconostoc qu'avec Lactobacillus. Enfin, NEGRE(I59) conseille soit l'ensemencement par levains, soit le coupage avec un vin en cours de rétrogradation malique.

A titre de curiosité, indiquons qu'un auteur, en l'occurrence: DITTRICH(I60) a fait des essais de décomposition de l'acide malique avec une levure de la famille des Schizosaccharomycès. Cette levure qui attaque l'acide malique a besoin de température plus élevée que les levures alcooliques traditionnelles. Le côté théorique intéressant de cette dégradation, est que contrairement aux bactéries, cette levure transforme l'acide malique sans production d'acide lactique, mais avec semble-t-il formation d'alcool éthylique.

3

BIBLIOGRAPHIE DES

TRAVAUX AYANT POUR

OBJET D'EVITER LA

FERMENTATION

MALOLACTIQUE

Les oenologues de certains pays ou régions de France, qui regardent la fermentation malolactique comme une maladie qu'il faudrait éviter, sont assez peu nombreux, mais si ils désirent éviter cette désacidification biologique, ils n'ont pas pour autant trouvé le moyen d'arriver à ce résultat.

Au Colloque Oenologique de Mâcon, SCHWARTZ (83) évoquant le problème de la fermentation malolactique en Alsace, précise que si les Sylvaner, les Chasselas et les Pinot blanc supportent avec amélioration cet abaissement d'acidité; les Riesling par contre perdent de leur bouquet par cette désacidification biologique, l'acidité, dit-il, étant considérée comme le support du fruité. A cette même réunion, BOUFFARD (I61) représentant la région méridionale, était assez circonspect vis à vis de cette transformation malique. En 1962, RADLER (I05) parlant de cette dernière, s'exprime ainsi: «bien qu'elle soit un chemin naturel vers la diminution d'acidité, elle n'est pas toujours et partout avantageuse». A l'heure où nous écrivons ces lignes, PEYNAUD (I62) après avoir énoncé l'amélioration apportée aux vins rouges par cette fermentation, constate que pour les vins blancs: «il ne faut pas généraliser l'utilité de la fermentation malolactique».

Pour les vins soumis à l'élaboration du Cognac, LAFON (I63) ne cherche pas à provoquer la désacidification par les bactéries, loin de là! En effet, pour la distillation l'anhydride sulfureux est à rejeter, d'où un problème de conservation. Pour obtenir une meilleure stabilité vis à vis des maladies microbiennes des vins, il est indispensable de leur conserver un pH le plus bas possible, donc au moins le pH initial; en attendant le moment de distiller. Cette région aurait donc tout intérêt à bloquer dès le départ la prolifération de microorganismes lactiques.

ROSENSTEIN (I64) en Israel, cherche lui aussi à garder une acidité de titration assez importante, puisqu'il la souhaite de 7,5 g/L exprimée en acide tartrique (soit 4,90 g/L exp en H_2SO_4).

KADAR (I65) affecte à l'acidité une influence prépondérante pour l'obtention de vins de qualité; pour cela il faut être maître de l'acidité et pouvoir éviter la décomposition de l'acide malique.

Enfin en U.R.S.S. KONDO et FADENKO (I43) mentionnent que le déclenchement de la fermentation malolactique gêne le développement du voile pendant la jerezation.

4

DISCUSSIONS

DES TRAVAUX

PRECITES

(Dans ce 4° figurent aussi des références de biochimie et de microbiologie générale sans lien direct avec le phénomène malolactique. Ces travaux ne pouvaient paraître dans les rubriques précédentes qui, elles ne relataient que les publications orientées sur la désacidification biologique.)

La lecture de la bibliographie que nous venons d'exposer, permet de constater des divergences de vue entre les auteurs; certains avis contraires proviennent d'un manque d'approfondissement de la question comme nous pourrions le mettre facilement en relief au cours de nos recherches personnelles principalement pour les matières tannoïdes et les aminoacides.

Cependant nous allons essayer de dégager, après étude, la théorie la plus vérifiée dans différentes directions. Nous pourrions donc examiner successivement. "1" le SO_2 et le pH; "2" les tanins; "3" l'antagonisme microbien; "4" les vitamines; "5" l'azote; "6" Les aminoacides..

"1" SO_2 et pH.

L'anhydride sulfureux n'a sans doute pas la puissance bactéricide que lui octroient certains chercheurs surtout si elle est comparée à l'ac-

tion fongicide sur les levures. Un rapport de SCHANDERL(166) illustre très bien notre remarque. Ce dernier explique le rôle du soufre vis à vis de la levure. Les levures réduisent pendant et après la fermentation alcoolique, les combinaisons du soufre. Elles sont détruites par l'effet synergétique du soufre et de l'alcool, elles se transforment et deviennent "méconnaissables" perdant leur pouvoir fermentatif. Mais l'auteur un peu plus loin mentionne: «Des opérations similaires se déroulent aussi pour les bactéries du vin, mais des bactéries de décomposition d'acide peuvent encore sous forme altérée, la forme dite "S₈ INVOLUTIONS FORM", transformer l'acide malique en acide lactique»

La complexité du phénomène nous est montrée par INGRAM (I67) qui a étudié d'une façon très complète l'action antimicrobienne de l'anhydride sulfureux. Le résumé de son travail est le suivant: « Des expériences de l'auteur, on peut conclure que seul le SO₂ libre (c'est à dire titrable par l'iodide) est actif sur les levures, sous forme H₂SO₃; et que, dans les systèmes naturels, une petite partie seulement de cette forme est efficace. Les expériences de SCARDOVI (I68)(I69)(I70)(I71) montrent également que H₂SO₃ est la molécule active, mais donnent également le résultat apparemment inconsistent que la fraction efficace est comparable à la quantité totale de SO₂ présent. Avec les bactéries en solutions à peu près neutres, les ions HSO₃ sont efficaces bien qu'à concentrations plus grandes».

«D'après les réponses très variables des populations de levures, il y a présomption que le résistance au SO₂ varie fortement parmi les cellules individuelles de la même souche; mais les recherches génétiques n'ont pas encore révélé la base de telles différences. Une adaptation à long terme semble l'explication la plus prometteuse».

«La résistance au SO₂ n'est pas le résultat d'une faculté de détruire l'inhibiteur par réduction ni de l'éliminer par combinaison avec l'acétaldéhyde, bien que les levures fermentant fortement sont généralement plus résistantes. Il semble plus probable que le sulfite agit en interférant dans le métabolisme de l'acétate qui est prédominant pour les espèces fermentant peu. Des recherches supplémentaires sont cependant désirables».

Au point de vue physique, c'est le pH qui est le facteur conditionnant rigoureusement la dégradation de l'acide malique, et non l'acidité totale. On a pu remarquer par exemple en 1963 un déclenchement assez fréquent malgré une acidité totale assez élevée.(SCAZZOLA (I72).

"2" Tanin.

La question des matières tannoides, nous a laissé aussi des avis très divers. Cependant NEGRE(I32) montre bien que le gallotanin a une influence favorable sur la fermentation alcoolique, et par contre gêne les bactéries beaucoup plus sensibles à cet élément. Un peu plus loin, le même auteur, indique que l'œnotanin et les matières colorantes ont une influence beaucoup plus faible sur les ferments de maladie du vin, que les gallotannins. Ceci prouve qu'il y a lieu de faire une différence entre les tanins naturels du vin et les tanins œnologiques que l'on peut leur apporter. Dans sa thèse intitulée: «Contribution à l'étude des matières tannoïdes du vin»; NEGRE (I73) fait bien cette discrimination entre les tanins pathologiques (excroissances se développant sur les végétaux à la suite de piqure d'insectes) et les tanins physiologiques(existant normalement dans les végétaux). Nous savons que le tanin de noix de galle employé en œnologie, dans notre région surtout, est à classer avec les premiers et que les tanins naturels du Muscadet ou du Gros-plant, sont à ranger évidemment avec les seconds.

Dans la conclusion de son paragraphe «Les matières tannoïdes du vin»; NEGRE(I73) s'exprime ainsi: « Si le vin contient du tanin pyrogallique à côté des tanins pyrocatechiques et des polyphénols-non-tanins, ce n'est qu'en proportion très faible et nous n'avons pas pu le caractériser».

Rappelons que les tanins pyrogalliques sont des tanins hydrolysables, qui donnent par distillation sèche du pyrogallol. Nous trouvons deux catégories dans cette première classe: 1) certains sont des hétérosides, donc à l'hydrolyse ils fournissent du glucose, de l'acide gallique et souvent aussi de l'acide élagique. 2) d'autres ne donnent pas de glucose à l'hydrolyse, ce sont des depsides qui sont des esters d'acides phénoliques entre eux.

Les tanins pyrocatechiques à la distillation sèche, fournissent du pyrocatechol ou pyrocatechine.

Un fait qui met en évidence la différence de propriétés des tanins physiologiques et des tanins pathologiques (ou œnologiques), nous est rapporté par NEGRE (I32): «Pendant longtemps, dit il, on a cru que la graisse ne pouvait se développer que dans les vins blancs parcequ'ils étaient pauvres en tannin; cependant en Champagne, on constate que ce sont les vins constituant les rebêches, provenant de moûts recueillis en fin de pressurage, ceux qui contiennent le plus de tanin, qui sont les plus facilement atteints. On peut néanmoins enrayer la maladie par addition de gallotanin à condition d'en ajouter suffisamment.....» Notre étude sur le pressurage et son influence sur le développement malolactique est tout à fait en accord avec les lignes précéden-

tes qui peuvent se résumer ainsi: les tanins physiologiques n'ont aucun effet sur la flore malolactique. Nous sommes les premiers, à notre connaissance, à fournir une explication biologique sur la grande aptitude des jus de fin de serrage, au déclenchement malolactique.

Pour continuer l'analyse des propriétés inhibitrices du tanin, citons que certains chercheurs, H. JENSEN (I74), SCHERB (I75) ont remarqué et démontré un pouvoir bactéricide dans les vins rouges, localisé au niveau des tanins, polyphénols, matières colorantes, mais cet effet est réservé dans leur travail, sur le bacille d'EBERTH (fièvre typhoïde) et à Eschérichia coli. Il n'est donc pas prouvé à cette occasion d'action vis à vis de microorganismes évoluant dans le vin, problème d'ailleurs différent de celui des microbes pathologiques pour l'homme.

Enfin SCHANDERL (I76) par ses tests spéciaux de titrage à pH 7, obtient une évaluation des polyphénols et des tanins. Il souligne que ces corps sont moins efficaces sur les levures alcooliques que sur les levures aérobiques et apiculées; sans toutefois négliger une action sur les premières lorsqu'il y a en même temps augmentation d'alcool.

"3" Rapports entre levures et bactéries.

Dans la bibliographie que nous venons de citer, les auteurs sont assez peu nombreux à avoir remarqué un antagonisme entre les levures et les bactéries lactiques. On trouve par contre des travaux de microbiologie qui traitent des rapports des microbes entre eux.

Dès 1926, BOULARD (I77) par sa technique d'immunisation des vins, pensait qu'il s'agissait, en plus des éléments consommés, de toxines sécrétées par la levure. MALVEZIN (I78) apporte aussi une confirmation de la production de corps fongicides élaborés par la levure. Mais pour le cas qui nous intéresse ici, on ne voit pas encore de propriétés de ces substances inhibitrices vis à vis de microorganismes différents de ceux qui ont servi à produire ce "vaccin". Les deux auteurs (I77)(I78) ont cherché à éviter des refermentations alcooliques, les corps inhibiteurs sont excrétés par des cultures successives de levures. Dans les essais de MALVEZIN, le liquide décanté contenant le "vaccin" est efficace contre les levures, mais n'a aucune action sur les bactéries de mannite.

Plus tard (I947), SEIGNEURIN, CARRAZ, ROUX et SYNDICO (I79) réussissent à extraire de la levure de bière et de bactéries acétiques, à l'aide de solvants organiques en pH acide, un élément doué de pouvoir bactéricide. Leur technique se déroule comme suit: les extractifs précités sont distillés à faible pression sous une température maximale de 45°C. Le résidu de distil-

lation se sépare à basse température en deux phases; l'une liquide inactive, l'autre solide active. Par la technique des zones d'inhibition ces chercheurs ont pu mettre en évidence un pouvoir bactéricide sur certains bacilles

Dans un ouvrage intitulé «Antagonismes microbiens et substances antibiotiques», WAKSMAN (180) a étudié les comportements et réactions des microorganismes entre eux. Se rapprochant davantage de notre sujet, citons CARBALLO CAABEIRO (181) qui a observé un ralentissement ou même un arrêt de fermentation alcoolique causé par le Botrytis cinerea. Il émet l'idée que ce champignon pourrait avoir une influence nulle sur les bactéries lactiques et que l'on pourrait ainsi en freinant la levure, favoriser la désacidification biologique. S. LAFOURCADE (182) dans sa très belle étude sur les activateurs et inhibiteurs de la fermentation alcoolique a mis en relief les rapports cryptogames-levures; levures-bactéries et champignons entre eux. On trouve aussi dans son travail le développement de la formation d'un antibiotique agissant sur les levures, et synthétisé par Botrytis cinerea.

Dans la brasserie, l'antagonisme a été étudié par STRANDSKOV et BOCKELMANN (183) qui concluent que la variété de levure exerce une influence sur le développement de certaines souches bactériennes au cours d'une fermentation. GRAY (184) a fait les mêmes constatations sur la bière également, à savoir; qu'en présence d'un excès de levures les bactéries d'infection ne peuvent pas se multiplier lorsqu'elles sont présentes en quantités réduites.

Enfin la remarque de BRUGIRARD, ROQUES et DIXONNE (185) illustre bien la fin de ce paragraphe, puisqu'il a constaté que le déclenchement malolactique s'effectuait souvent pendant un arrêt de fermentation alcoolique.

"4" Vitamines.

La nutrition des microorganismes responsables de l'élaboration des vins est complexe, et les recherches sont certainement moins avancées dans le domaine des bactéries, les lactiques surtout, que dans celui des levures. Cet état s'explique par le fait que l'action des levures est restée longtemps plus spectaculaire, ou plus observée, que les autres transformations dans le vin; parce que régissant la production d'alcool. Ensuite les recherches se sont orientées vers la piqûre ou les autres altérations. Nous avons donc trouvé dans notre "sphère malolactique" peu de références sur la nutrition vitaminique des bactéries. Nous pouvons cependant tirer les idées essentielles, soit: action de la thiamine (vit B 1) et riboflavine (vit B 2). Il serait bon rappeler que FLANZY, CAUSERET, HUGOT et GUERILLOT (186) ont mentionné une action dévitaminisante se portant sur la thiamine dans les vini-

fications avec un emploi non surveillé de SO_2 , MORGAN, NOBLES, WIENS, MARSH et WINKLER (I87), PERLMAN et MORGAN (I88). Cette propriété du SO_2 serait peut-être une explication de l'action de cet antiseptique sur les bactéries malolactiques, surtout pour l'irrégularité de ses effets. Sur la riboflavine (vit B_2 ou lactoflavine), les recherches de S. LAFOURCADE et PEYNAUD (I89) nous apportent de la lumière. Premièrement ces auteurs énoncent: «On sait que la riboflavine est un facteur de croissance essentiel pour les bactéries lactiques. Elle conditionne la multiplication des bactéries malolactiques». Cette affirmation résulte, comme ils l'indiquent d'ailleurs, d'une étude de PEYNAUD (I90). Secondairement, les chercheurs bordelais nous font savoir que la riboflavine augmente pendant la fermentation, et particulièrement à la fin; que son élaboration provient des levures et que ces dernières en produisent davantage en aérobiose qu'en anaérobiose. Le taux de riboflavine est 4 à 6 fois plus élevé dans un vin que dans un moût. Comme l'état oxydo-réducteur est important pour cette synthèse, il est facile de comprendre, en accord avec FLANZY et coll. (I86), que le SO_2 par ses propriétés réductrices, freine cette formation. Si PEYNAUD et S. DOMERCQ (I89) confirment l'effet bénéfique de la riboflavine sur les microorganismes lactiques, NEGRE (I9I) souligne une consommation de thiamine (vit B_1 ou aneurine) par la dégradation malolactique.

Il nous semble donc, que dans l'état actuel de nos connaissances, ces deux vitamines B_1 et B_2 sont les plus importantes pour la dégradation biologique de l'acide malique; en dehors bien sûr des autres facteurs ou vitamines dont le rôle est encore mal connu ou moins perceptible.

"5" Azote.

Dans l'étude de S. LAFOURCADE (I82) précédemment citée, on peut constater un effet stimulant du phosphate d'ammoniaque sur la levure; l'action de ce produit est commandé par le radical NH_4 et non par le radical PO_4 . Des courbes tracées par cet auteur, sur la croissance des levures et sur la fermentation en présence de ces éléments, on déduit une rémanence des effets du radical NH_4 ; rémanence plus importante avec des doses faibles (20 mg/l) qu'avec des doses atteignant 200 mg/l. En un mot, les courbes fermentaires relatives aux faibles apports d' NH_4 sont plus 'ascendantes' et ne comportent pas de palier en fin de fermentation. C'est pourquoi il nous a semblé en lisant cette étude, que l'on pouvait utiliser cette propriété pour faire jouer un antagonisme levure-bactérie.

"6" Aminoacides.

Au moment où nous écrivons ces lignes, l'Ecole de Bordeaux vient de publier une étude des besoins nutritionnels de 64 souches de bactéries lactiques isolées de vins, ceci sous la signature de PEYNAUD, S. LAFON-LAFOURCADE et S. DOMERCQ (I92). Dans leur travail les besoins en aminoacides sont étudiés séparément pour les bacilles et pour les coques. Pour les premiers microorganismes,

l'acide glutamique, l'isoleucine, la leucine et la valine sont indispensables; pour les seconds en plus de ces quatre éléments il faut ajouter l'arginine, l'histidine, la méthionine, la phénylalanine, la sérine, le tryptophane et la tyrosine. Les aminoacides les moins utilisés par les bacilles sont: la proline, la lysine, le glycocolle et l'histidine; pour les coques on retrouve les mêmes sauf l'histidine qui passe dans les facteurs essentiels.

Cette dernière citation (192) prouve bien le rôle prépondérant de ces acides, mais notre étude personnelle met en relief la grande importance de certains d'entre eux, puisque leur absence suffit à bloquer toute rétrogradation malolactique.

5

C O N C L U S I O N S

de la bibliographie

Peu de conclusions claires à tirer de la lecture des travaux antérieurs; le déclenchement malolactique reste capricieux, il est aussi difficile de l'arrêter que de le provoquer.

L'anhydride sulfureux n'a pas toujours une influence notable sur les bactéries.

Les tanins semblent avoir un rôle irrégulier.

Des vitamines, la riboflavine semble la plus importante.

Dans les aminoacides, un grand nombre paraissent indispensables.

Cette bibliographie, par sa lecture, permettra cependant de mieux comprendre le mécanisme des phénomènes biochimiques entrant en jeu dans notre technique spéciale de vinification; elle fera mieux se détacher nos recherches.

DEUXIEME

PARTIE

TRAVAUX

PERSONNELS

C h a p î t r e 1

P r é l i m i n a i r e s

A) OBSERVATIONS EFFECTUEES DANS LE VIGNOBLE.

L'orientation générale d'une technique de vinification pour éviter la fermentation malolactique dès l'automne ou l'hiver, a été obtenue par l'examen des vins malades et par les différentes observations et constatations que nous avons effectuées chez des viticulteurs dont les moûts rétrogradaient tous les ans, indépendamment des conditions de maturation à la récolte.

Nous avons remarqué les faits suivants:

1°) L'anhydride sulfureux était sans grande efficacité, car dans cette région septentrionale de la culture de la vigne on est très limité pour les doses à employer (50 mg/l max). Au dessus de cette valeur la fermentation alcoolique ne se fait pas ou se fait très mal, ne s'achevant en général qu'au printemps suivant.

2°) Une cave mal aérée donnait toujours des vins "bleus", pour employer le terme de SCHANDERL(47) désignant des vins ayant subi la fermentation malolactique. Nous avons vu que d'autres chercheurs ont remarqué l'influence du CO₂ comme facteur de prédisposition à la rétrogradation malique SCHANDERL(47), MICHEL(82); leurs observations toutefois ne concernaient pas

les celliers mal ventilés. Nos nombreuses constatations se vérifiant sur ce point, trouvent une explication dans la forte production de CO_2 par la levure pendant la fermentation alcoolique.

3°) Une chaptalisation (Légale en Loire Atlantique) qui n'est pas réalisée dès la sortie du pressoir, place le moût en conditions favorables pour la désacidification biologique.

4°) Un abaissement de la température extérieure entraînant une chute de quelques degrés centigrades dans les celliers (loin d'être isothermes) ralentit la marche de la fermentation alcoolique. Dans ce cas les bactéries lactiques prennent la relève des levures. Un antagonisme entre levures et bactéries est une explication de ce phénomène.

5°) Les tanins de noix de galle ont une action légèrement inhibitrice sur les bactéries malolactiques, à l'inverse des tanins de châtaigner qui n'en ont aucune.

6°) Les moûts contiennent toujours suffisamment de bactéries malolactiques. Des numérations effectuées sur des jus de Muscadet avant toute évolution microbienne, concrétisent cette affirmation.

La fermentation malolactique étant de plus en plus remarquée dans la région du Muscadet, il nous semble qu'il s'agit d'une conséquence des fongicides actuels employés pour combattre le champignon du Mildiou, de l'Oïdium. Les levures sont certainement sensibles à cette action, et il se pourrait que l'accumulation avec les années, de ces produits antiseptiques paralyse ces premières et favorise les bactéries par antagonisme.

7°) Les tanins physiologiques plus abondants dans les fins de serrage ou provenant de serrages excessifs du pressoir; n'ont absolument aucune action retardatrice sur le déclenchement malolactique, bien que l'indice de permanganate soit très élevé dans ces jus.

L'étude que nous avons faite sur le taux d'azote organique en fonction du pressurage GENDRON (I93) (I93bis) montre qu'il faut faire la discrimination entre les polyphénols apportés par cette action mécanique sur la vendange et les éléments azotés qui en résultent au même stade par la même cause. En admettant même que les tannoïdes naturelles du vin aient une action légèrement inhibitrice, cette dernière est très largement compensée, totalement masquée, par l'apport d'activateurs issus des parties de la vendange qui sont sou-
mises au derniers serrages.

C'est la coexistence de ces activateurs et des matières tannoïdes du moût qui a empêché, jusqu'à maintenant d'y voir bien clair sur les propriétés des tanins physiologiques vis à vis des bactéries malolactiques.

Nous résumerons ainsi nos observations:

1°) L'influence du SO_2 est minime et son emploi doit être limité dans notre région.

2°), 3°), et 4°). Le CO_2 , la chaptalisation non rationnelle, l'abaissement de température, ralentissent le travail des levures et par là deviennent facteurs favorables aux bactéries.

5°) Les tanins de noix de galle ont une action légèrement inhibitrice.

B) DEDUCTIONS DE NOS OBSERVATIONS ET BASES GENERALES EMISES AU DEPART DE NOS RECHERCHES.

La lecture des lignes précédentes nous montre clairement que pour éviter la rétrogradation de l'acide malique, il faut placer la levure dans des conditions optimales de travail, pour avoir une courbe de fermentation alcoolique régulière, sans perturbations.

Pour arriver à ce résultat, nous avons cherché à accélérer la levure dans sa prolifération et dans son action sur le sucre. En même temps il fallait freiner le développement bactérien.

Pour l'activateur de fermentation alcoolique, la législation œnologique actuelle n'offre que la possibilité d'emploi des composés phosphato-ammoniacaux. Les propriétés de ces derniers ont été étudiées par S. LAFOURCADE (182) pour leurs effets sur la levure; ainsi que FERNBACH (194). A notre connaissance, aucune étude de la répercussion de ces composés sur les bactéries malolactiques des mûts, n'a été publiée.

Dans les inhibiteurs malolactiques, la bibliographie n'offre aucun produit. Aussi au départ avons nous cherché à bloquer le développement bactérien par abaissement du potentiel d'oxydo-réduction à l'aide de substances réductrices où figurent les tanins. Ces derniers, à notre avis, pouvant être considérés comme catalyseurs négatifs et antioxygènes, puisque dans cette dernière catégorie de réducteurs se trouvent les substances phénoliques comme l'hydroquinone, le pyrogallol.

Enfin, à la suite d'essais de laboratoire, nous avons remarqué qu'une très légère addition d'anhydride sulfureux (37 mg/L en moût) renforçait les propriétés spécifique de cette technique.

Pour éviter la fermentation malolactique, personne n'avait pensé à grouper un ensemble de facteurs de telle façon que leurs propriétés vis à vis des bactéries lactiques s'additionnent, et notre technique révèle un exemple frappant de synergie.

Restaient donc les doses à déterminer et l'équilibre entre elles, celà représente le travail expérimental de laboratoire que nous verrons plus loin, ce pré-travail a été accompagné d'essais sur fûts. Pendant la préparation technique de ces expériences, nous avons pu remarquer que chacun des produits pris séparément n'a aucune action, certains employés seuls ont une activité même, opposée à celle désirée ici. (c'est le cas du phosphate di-ammonique, par exemple, qui isolé, favorise la rétrogradation malique).

C'est donc l'EQUILIBRE de ces trois facteurs qui est important à considérer. L'ANALYSE DES CONSEQUENCES DE CE PROCEDE, ET L'EXPLICATION BIOCHIMIQUE DE SON MODE D'ACTION, SONT LES DEUX POINTS PRINCIPAUX ETUDIES DANS NOTRE TRAVAIL PERSONNEL. Rappelons que ce procédé, à notre connaissance, est inédit pour bloquer la fermentation malolactique dans les vins.

Chapître 2

Matériel & Techniques

1) METHODES ANALYTIQUES.

Les différents modes opératoires que nous décrirons, sont classés par fonction et selon l'élément recherché. Par exemple les méthodes chromatographiques utilisées pour l'étude des aminoacides, sont ordonnées non pas dans une rubrique 'chromatographie', mais au paragraphe 'aminoacides' lui-même rangé dans la catégorie générale 'acides'.

A) Acides.

§ 1. Aminoacides.

Ceux-ci sont dosés par chromatographie bi-dimensionnelle sur papier. Nous nous sommes inspirés de la méthode publiée par BOULANGER et BISERTE (195) dans les Exposés Annuels de Biochimie Médicale.

Pour les mouls, nous avons mis personnellement une méthode au point.

Solvants.

Butanol-acétique saturé. 400 ml de Butanol R.P. sont additionnés de 100 ml d'acide acétique pur cristallisable, après mélange on agite le butanol acétique avec 500 ml d'eau distillée (sur verre). On laisse reposer 12 heures au minimum et on décante ensuite. La partie supérieure représente le butanol acétique saturé, la partie inférieure est l'eau de saturation.

Phénol saturé. On prépare tout d'abord une solution stock de phénol, de la façon suivante: 900 g de phénol R.P sont additionnés de 100 ml d'eau distillée (ou 1 kg de phénol avec 111 ml d'eau), cette préparation a l'avantage de rester liquide aux températures normales de laboratoire (avec chauffage normal l'hiver). Cette solution est conservée en flacons bien bouchés et à l'abri de la lumière. Pour l'obtention du phénol saturé, il suffit

d'agiter 500 ml de cette solution stock avec 400 ml d'eau distillée. On décante 24 h après au minimum, la partie supérieure représente l'eau saturée du phénol (densité 1006-1007 env), la partie inférieure étant le phénol saturé (densité 1052 env).

N.B. Si au cours de la préparation de la solution stock, le phénol reste en bloc difficile à dissoudre dans le flacon, on peut placer celui-ci à l'étuve bactériologique à une douce température.

Papier.

Pour toutes ces chromatographies d'acides aminés, nous avons utilisé le papier WHATMAN N°1 (BIOLYON).

Modes opératoires.

1) Vins.

Technique bi-dimensionnelle descendante.

Dans un papier WHATMAN N°1 on découpe des feuilles de 51 cm sur 46,5 cm. La solution à étudier est placée à l'aide d'une micropipette à l'intersection de deux lignes tracées à 8 cm du bord gauche et du bord supérieur de la feuille (voir fig.5).

Le chromatogramme est plié pour être placé dans le godet contenant le solvant. On réalise les plis suivant les figures 5 et 6, c'est à dire à 1 cm, 2,5 cm et 4 cm du bord gauche et du bord supérieur de la feuille.

Le papier ainsi préparé est placé dans les godets horizontaux comme le montre la figure 7. Les godets sont en réalité des tubes de chlorure de polyvinyle coupés dans le sens longitudinal et fermés aux deux extrémités. Un agitateur en verre est placé dans le fond de chaque godet (au creux du pli N°1) pour obtenir un départ rectiligne du papier et empêcher son glissement. Un autre agitateur est indispensable au pli N°3, à côté de chaque bac à solvant, pour éviter le ruissellement de ce dernier le long du papier. La cuve est également en chlorure de polyvinyle (épaisseur 6mm), ses dimensions sont: hauteur 65 cm, largeur 31 cm, longueur 56 cm. Dans chaque bac à solvant on peut placer deux chromatogrammes en opposition. (Les figures 8 et 9 montrent la disposition des papiers placés dans la cuve en chromatographie descendante)

Le solvant est placé avec beaucoup de précautions dans les godets de façon à remplir ceux-ci aux 8/10 de leur volume.

L'eau de saturation est mise dans des cristallisoirs au fond de la chambre.

Le temps de chromatographie est environ de 20 heures à 36.

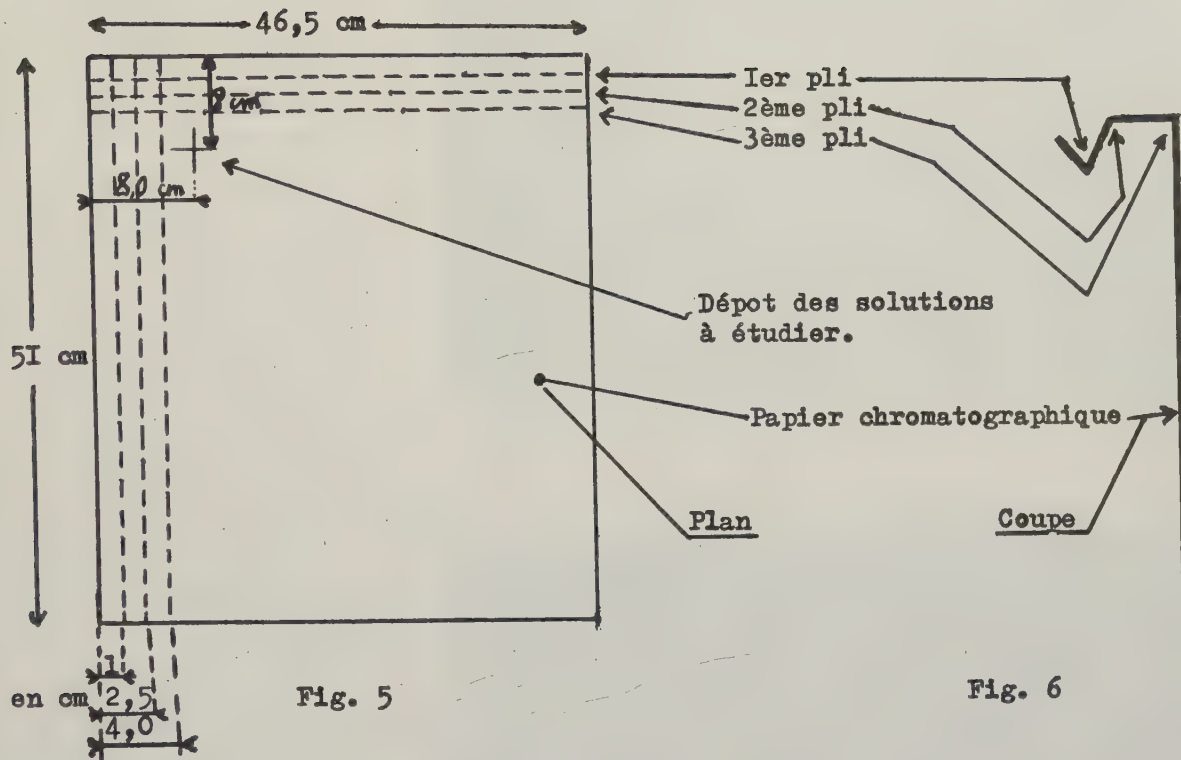


Fig. 5

Fig. 6

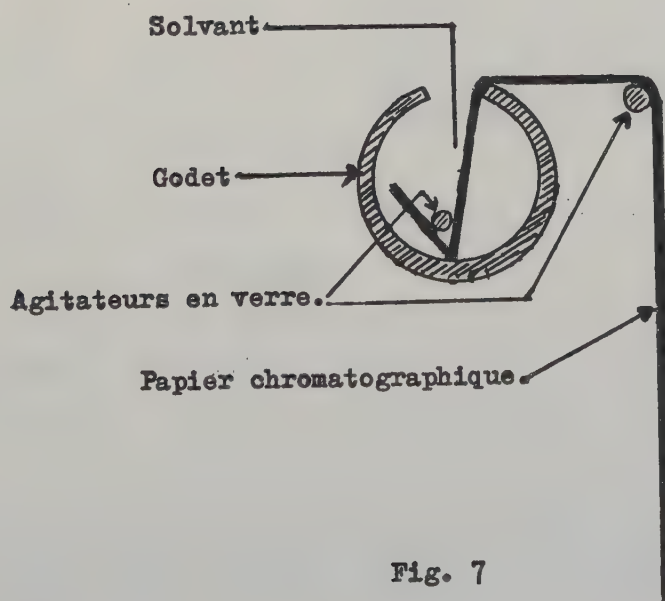


Fig. 7

heures à la température de 16°C.

La première dimension s'effectue en général au butanol-acétique saturé, on sèche ensuite 2 jours en air ventilé, puis la seconde dimension est traitée au phénol saturé suivi d'un séchage de 2 à 3 jours en air ventilé tiède. (il faut évaporer le solvant et éviter sa cristallisation par de trop faibles températures).

Pour accélérer certains aminoacides (aminoacides basiques), on ajoute quelquefois à l'eau de saturation, de l'ammoniaque à raison de 0,1%, 0,3% ou 3,0% en volume. Les aminoacides basiques sont en effet freinés en atmosphère acide; parmi ces acides citons: 1(+)-Lysine, 1(+)-Arginine, 1(-)-Histidine.

Révélateur.

On utilise la ninhydrine dans le butanol saturé. A cet effet on pèse 400 mg de ninhydrine pour les dissoudre dans 400 ml de butanol R.P. On agite et on laisse au repos 6 à 10 heures pour achever la dissolution; après ce délai on sature ces 400 ml par 500 ml d'eau distillée. Douze heures après (minimum) on décante la partie supérieure qui représente le révélateur. Trois jours de séchage, après la deuxième dimension phénol saturé, sont nécessaires avant de pouvoir révéler. La répartition du liquide révélateur est

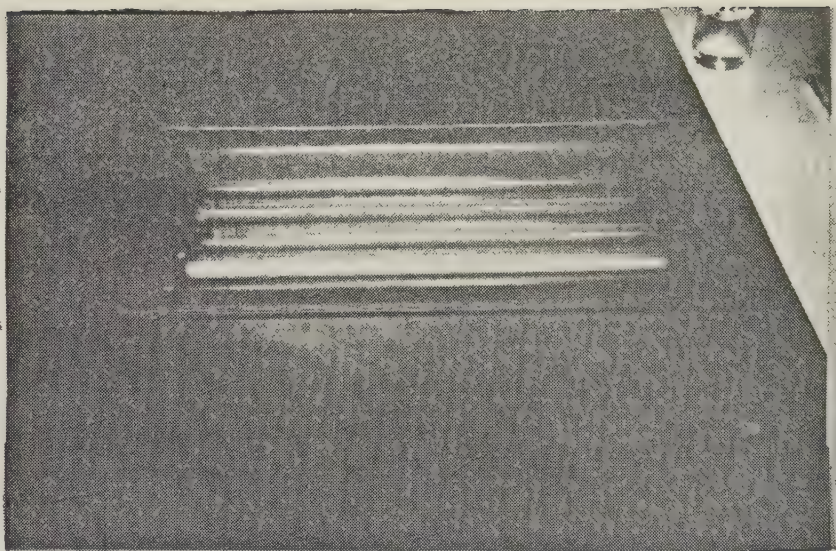


Fig. 8

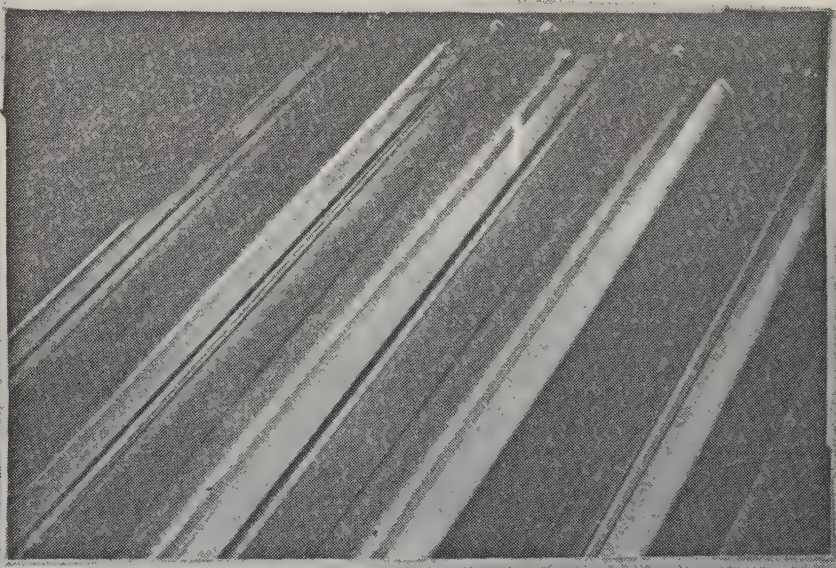


Fig. 9

assurée en pulvérisant celui-ci à l'aide d'un vaporisateur sur tout le chromatogramme. On sèche à l'air ventilé puis on place à l'étuve pendant 5 minutes à 105°C; c'est à ce moment que les taches apparaissent. Pour obtenir une plus grande longévité de ces dernières, il est conseillé de laisser un temps de quelques jours (2 à 3 j) pour le séchage entre la pulvérisation et le passage à l'étuve. A la révélation on obtient les couleurs suivantes:

Proline.....jaune.

Hydroxyproline.....rouge-orangé.

Histidine.....rouge gris-terne.

Tyrosine.....brunâtre.

Les autres aminoacides donnent des taches pourpre ou bleu-violet.

Pour pouvoir caractériser et estimer les aminoacides, il est indispensable de chromatographier dans les mêmes conditions de solvant et température, une série de solutions témoins d'aminoacides de titre connu. Pour le dépôt des prises d'essais on opère comme suit: Les micropipettes sont du type "colordur", elles comportent 2 traits à 0,05 ml et 0,1 ml. Pour plus de précision on utilise le volume de 0,05 ml existant entre le trait supérieur et le trait médian. On note au crayon (graphite) la référence de chaque échantillon sur le chromatogramme. Les

papiers sont alors disposés sur une table en laissant dépasser la partie qui recevra la prise d'essai. Avec deux tables parallèles, on peut mettre les papiers en vis à vis comme le montre la figure 10. Un radiateur électrique soufflant est placé au sol horizontalement, de façon à avoir un courant d'air chaud accélérant le sé-



Fig 10.

chage entre les dépôts. On veillera à ce que la température des papiers ne dépasse pas 30°C, pour éviter la détérioration des aminoacides. Les micropipettes sont placées rigoureusement en regard de chaque flacon comme le présente la figure 11 (on peut apercevoir 9 micropipettes devant 9 échantillons à analyser, une dixième micropipette est placées devant une solution d'aminoacides de titre connu servant de témoin comparatif).

Pour les vins
on dépose en général
5 ou 8 fois 0,05 ml;
avec séchage entre
chaque addition.

Le chromato-
gramme-test peut
comprendre plusieurs
aminoacides déposés
au même endroit sur
le papier.

Dans nos re-
cherches, nous avons
utilisé les prépara-
tions suivantes:



Fig. 11

2	additions de 0,05 ml d'une sol. à 500 mg/L Alanine DL.
2	0,05 500 mg/L Arginine L(+).
2	0,05 500 mg/L Phénylalanine DL.
2	0,05 500 mg/L Leucine DL.
1	0,05 1 g/L Glutamate de calcium.
2	0,05 500 mg/L Glycocolle.

Lecture.

Après révélation les chromatogrammes sont disposés sur une table, tous orientés dans le même sens après avoir repéré la direction des solvants. Les références portées initialement au crayon graphite sont refaites d'une façon durable au crayon bille. Sur le chromatogramme-témoin on note aussi la concentration de chaque tache que l'on entoure d'un trait.

La comparaison avec les chromatogrammes de vins est facile. En cas de difficultés pour la situation des taches, on peut superposer le témoin sur celui que l'on étudie.

Le témoin ne représentant que 6 aminoacides tout au plus, il sera bon de se reporter à un tableau donnant le R_F de ces éléments.

$$R_F = \frac{\text{distance parcourue par la substance}}{\text{distance parcourue par le front du solvant}}$$

d'où l'on tire:

$$\text{distance parcourue par la substance} = \text{dist. parcourue p. solvant} \times R_F$$

Voici un tableau de BOULANGER et BISERTE (195) donnant le R_F de plusieurs aminoacides avec différents solvants.

R_F des AMINOACIDES. Selon BOULANGER et BISERTE. (195)					
Tableau XXXXI					
Aminoacide	Solvants				
	Phénol (HCN)	Phénol (NH ₃)3%	Collidine	Butanol Acétique	Alcool Benzylque.
Glycocolle	0,40	0,40	0,25	0,12	0,02
Alanine	0,54	0,54	0,32	0,19	0,03
Valine	0,77	0,76	0,45	0,37	0,11
Isoleucine	0,86	0,81	0,54	0,49	0,18
Leucine	0,85	0,83	0,58	0,50	0,21
Phénylalanine	0,89	0,87	0,59	0,45	0,36
Tyrosine	0,64	0,63	0,64	0,33	0,14
Serine	0,36	0,33	0,28	0,12	0,01
Thréonine	0,50	0,41	0,32	0,15	0,02
Hydroxyproline	0,67	0,50	0,34	0,11	0,04
Proline	0,91	0,85	0,35	0,15	0,12
Tryptophane	0,83	-	0,62	0,41	-
Histidine	0,69	0,68	0,28	0,08	0,02
Arginine	0,59	0,89	0,16	0,10	0,01
Lysine	0,46	0,82	0,14	0,06	0,00
Acide aspartique	0,15	0,12	0,22	0,07	0,00
Acide glutamique	0,25	0,13	0,25	0,14	0,00
Methionine...	0,80	0,76	0,57	0,37	0,17

Il est facile en s'aidant de la règle à calcul, d'obtenir rapidement le R_F de la tache cherchée, et de comparer ensuite sa concentration et son étendue avec le témoin dont on connaît la valeur en mg/L.

Fixation.

La fugacité des taches est compensée par une fixation. La seule valable est la photographie en couleurs immédiatement après révélation et repérage des taches. Nous avons procédé avec une ouverture de diaphragme de 22, une vitesse d'obturateur 1/30 s, une lentille de premier plan, et un film Kodachrome II,15 DIN ou 25 ASA, lumière du jour. Les prises de clichés sont toutes faites au flash avec ampoules bleues type XMI_b. Dans ces

conditions, la fidélité des couleurs est excellente.

Pour conclure l'exposé de ce premier mode opératoire, soulignons que nous avons travaillé avec les vins directement, sans aucune préparation ou percolation sur résines échangeuses d'ions; ce qui nous garantit le stock initial des aminoacides et leur répartition d'origine.

L'application, par contre, de la technique précitée sur les moûts, ne nous a pas donné entièrement satisfaction; l'entraînement des aminoacides étant freiné, surtout dans la phase butanol. Ces chromatographies, comme nous le verrons plus loin, nous ont permis cependant des comparaisons intéressantes, on se trouve alors devant un défrichage comme dans une seule dimension. Nous avons donc été contraints, dans ces premiers dosages sur moûts, de grouper certains aminoacides entre eux. Ce manque de rigueur, nous a obligés à mettre au point une technique personnelle.

2) Moûts.

Méthode personnelle bi-dimensionnelle ascendante.

a) Préparation du moût à la chromatographie.

Nous avons cherché au préalable quel était l'élément présent dans les moûts et non dans les vins et qui perturbait la migration des aminoacides par un solvant du type butanol-acétique saturé; nous pensions que les sucres étaient le facteur ralentisseur, mais des essais nous ont fait écarter cette première hypothèse en nous montrant que ce retard dans le cheminement provenait des matières pectiques. Nous avons donc mis au point une préparation simple et rationnelle des échantillons, pour garder la valeur et l'équilibre des aminoacides présents dans le moût, le mode opératoire est le suivant;

Dans un tube à essais de I6 X I60, on place avec précision 1 ml de moût. On y ajoute 9 ml d'alcool absolu (C_2H_5OH % : 99,1 minimum). On agite par retournements et on laisse au repos pendant plusieurs mois. Cette précipitation se fait intentionnellement sans acide, pour éviter toute hydrolyse. Lors de la prise d'essais pour la chromatographie on tiendra compte de la dilution au I/10 ainsi obtenue, on fera 5 dépôts sur le papier chromatographique (avec séchage entre chaque addition, pour correspondre à 5 apports dans le cas normal.

b) Chromatographie.

L'expérience nous a montré que pour favoriser l'entraînement il fallait éviter de trop grandes vitesses du front du solvant. La technique ascendante permettait donc d'espérer des résultats dans ce sens, c'est ce que l'application a confirmé.

Nous avons modifié la cuve de façon à travailler avec les mêmes dimensions de papier, soit 51,0 cm sur 46,5 cm. Les solutions sont déposées à 5 cm de chaque bord gauche et inférieur. Les papiers sont suspendus, fixés à des agitateurs par pinces comme le montre la figure I2.

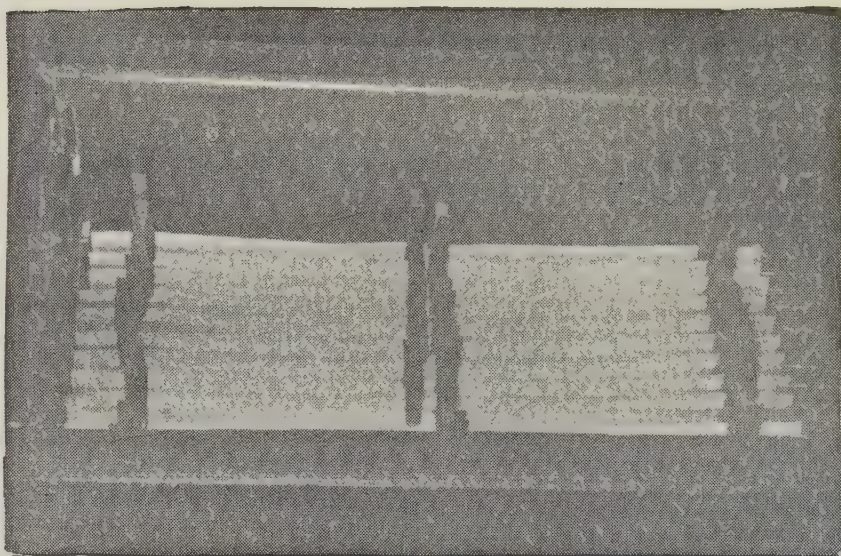


Fig. I2

La première dimension s'effectue au phénol saturé. On place cette phase au fond de la cuve. La migration est beaucoup plus longue et s'étale sur environ 72 heures. Après séchage de 2 à 3 jours on chromatographie par le butanol-acétique saturé, modifié par nous mêmes, comme nous l'expliquons plus loin. L'entraînement en phase butanol étant toujours plus difficile qu'en phase phénol, on s'arrange lors du dépôt des prises d'essais pour que la migration butanol se fasse dans le sens du papier. (indiqué par une flèche sur l'emballage Whatman d'origine).

Pour éviter la pulvérisation fastidieuse de ninhydrine, nous avons incorporé ce réactif dans la dernière phase; sa préparation est la suivante: 400 mg de ninhydrine sont dissous dans 400 ml de butanol R.P. Après dissolution on ajoute 100 ml d'acide acétique cristallisable, on mélange puis on sature par 500 ml d'eau distillée. Cette dernière disposition permet une réaction lente de la ninhydrine pendant le séchage et avant passage à l'étuve; on peut garder ainsi beaucoup plus longtemps les chromatographies visibles. En résumé notre méthode personnelle, tant pour la préparation des échantillons de moût que pour leur chromatographie, nous a donné des résultats très nets et comparables entre eux.

Préparation spéciale d'échantillons à la chromatographie
utilisée pour les essais T. (percolation sur résines)

Pour ces expériences (voir p.149 à 155) nous avons fait précéder les chromatographies d'une percolation sur résines échangeuses de cations, avec élution à l'ammoniaque pour recueillir les acides aminés.

Préparation de la matière échangeuse.

Dans un tube recourbé de forme analogue à celui présenté figure I2 bis, on place d'abord au fond un peu de soie de verre. On remplit ensuite le tube d'eau distillée et on y laisse tomber doucement 15 à 20 ml de résine DOWEX. (Dowex 50 x8x20/50 Mesh). Il est indispensable de faire ce chargement de résines une fois l'appareil plein d'eau, sans cette précaution, la matière échangeuse se tasse irrégulièrement et des circuits préférentiels s'établissent dans cette masse active, diminuant considérablement l'échange.

Après l'addition des résines, il faut que le niveau supérieur de la colonne échangeuse ainsi formée soit situé en dessous d'une ligne horizontale passant par le bec verseur de l'appareil; de façon que la matière active ne soit jamais découverte à sec par les liquides d'épuisement entraînés par le siphon.

Une fois ces conditions obtenues, on place un bourrelet de soie de verre sur le sommet de la colonne pour éviter la formation de tourbillons au cours du passage des différentes solutions. L'échangeur est surmonté d'une ampoule à décanter de 500 ml, où l'on placera les liquides à percoler. Chaque fraction sera versée une fois pour toutes dans l'ampoule, il suffira alors de régler le débit par le robinet de cette fiole à décantation.

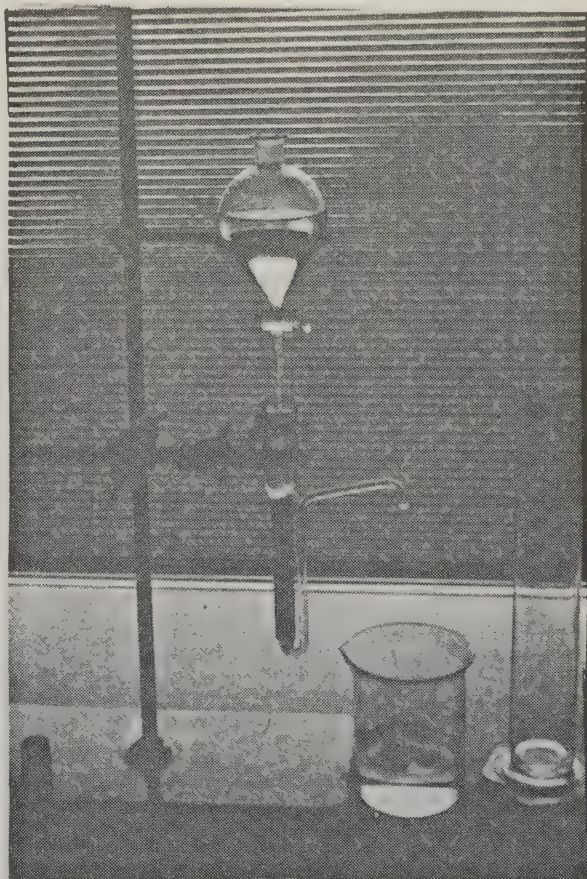


Fig I2 bis.

Mise en route de l'échangeur chargé de résines neuves.

Lorsque les résines sont neuves, on les active au début en passant alternativement des solutions de soude et d'acide chlorhydrique normales, séparées par des rinçages comme nous l'indiquons ci-dessous:

600 ml eau distillée.
200 ml NaOH. N
600 ml eau distillée.
200 ml HCl. N
600 ml eau distillée.
200 ml NaOH. N
600 ml eau distillée.
200 ml HCl. N
600 ml eau distillée. à ce stade l'appareil est régénéré

et prêt à recevoir le vin ou le moût.

Mode opératoire.

Sur l'échangeur régénéré, on verse à l'aide de l'ampoule à décantation 50 ml de vin. Une fois ce volume écoulé on fait passer ensuite 600 ml d'eau distillée. Le liquide de ces deux passages est jeté à l'évier. On recueille alors les aminoacides en éluant par 200 ml d'Ammoniaque 2 N. que l'on fait suivre de 200 ml d'eau distillée. Dans ces 400 ml se trouvent les aminoacides.

Pour régénérer l'appareil il faut le débarrasser aussi de ses cations, on y arrive en faisant passer successivement 200 ml d'eau distillée, 200 ml d'acide chlorhydrique N et 600 ml d'eau distillée; ces trois fractions sont jetées à l'égout. Après cette opération on peut à nouveau percoler 50 ml de vin.

Pour la chromatographie proprement dite, il faudra tenir compte de la dilution obtenue, puisque les aminoacides de 50 ml de vin se retrouvent finalement dans 400 ml d'une solution ammoniacale. Cette dilution au 1/8 pourrait être compensée par une évaporation sous vide à basse température (évaporateur rotatif), mais nous avons préféré multiplier par huit le nombre de nos additions sur les chromatogrammes.

§ 2 . A c i d e s o r g a n i q u e s .

La détermination de ces éléments par voie chimique est longue et fastidieuse, aussi est elle réservée aux cas de haute précision seulement, elle ne trouverait pas sa place ici. Il était beaucoup plus utile pour nous de connaître rapidement l'évolution d'un échantillon au niveau malolactique. Comme en plus il s'agissait souvent de comparaison de plusieurs vins ou moûts, nous avons, avec satisfaction, adopté la détermination par chromatographie sur papier. Cette méthode, comme les courbes et diagrammes d'ailleurs, est beaucoup plus parlante que les chiffres; cet avantage est important surtout lorsqu'il s'agit d'évaluations comparatives.

1°) Nous nous sommes inspirés de la méthode décrite par CHEFFTEL, MUNIER et MACHEBOEUF (196); la technique est unidimensionnelle.

Solvant.

Celui-ci est placé au fond des cuves; il est préparé de la façon suivante: à 100 ml d'alcool isopropylique on ajoute 100 ml d'eucalyptol et 40 ml d'acide formique, on mélange, puis le tout est saturé par l'eau distillée. A cet effet, on procède par petites affusions entre chaque agitations; lorsque le trouble devient persistant on arrête la saturation et on décante après un repos de 12 à 24 heures au minimum.

Papier.

Plusieurs types peuvent être utilisés: DURIEUX I22 bis, WHATMAN N°1 ou d'ARCHES 302. Les dimensions sont 23,5 cm X 28,5 cm.

Prises d'essais.

On travaille sur le vin ou le moût directement. Les prises d'essais sont très faibles (1 Goutte calibrée ou une addition de 0,05 ml) et sont déposées sur une ligne à 2 cm du bord inférieur de la feuille. Sur un chromatogramme des dimensions citées plus haut, on peut placer 5 à 7 dépôts d'échantillons distants de 30 à 35 mm. Sur le même papier on dépose aussi des témoins d'acide malique, lactique, tartrique. Ces témoins sont obtenus avec des solutions aqueuses contenant 12 % d'alcool en volume.

Révélateur.

On utilise généralement pour caractériser ces acides le bleu de bromophénol. Pour éviter la vaporisation fastidieuse d'un solvant contenant ce réactif, nous avons préféré, en nous inspirant de la technique de MICHOD (197), incorporer le bleu de bromophénol dans le solvant d'entraînement. La proportion est de 100 mg de BBP pour 100 ml d'alcool isopropylique auxquels on ajoute l'eucalyptol et l'acide formique avant saturation. (voir Solvant.)

Le séchage du chromatogramme est très important, il faut le réaliser à l'air neutre, dépourvu de toute vapeur légèrement acide; l'idéal est l'air extérieur pour la majorité des cas. Après séchage les acides apparaissent en jaune sur fond bleu. En partant de la base du chromatogramme on peut distinguer successivement: les acides tartrique, citrique, malique, citramalique, lactique et succinique.

Là aussi pour compenser la fugacité des taches, on fixe la chromatographie sur film couleurs Kodachrome II.

2°) Nous avons aussi utilisé la méthode MICHOD(197) avec le format initial de 13,0 cm X 23,0 cm ou le format personnel de 23,5 cm X 28,5 cm et un temps de migration évidemment plus long dans le second cas.

Solvant.

Dans 1000 ml de butanol normal on fait dissoudre 1 gr de bleu de bleu de bromophénol, on ajoute ensuite 250 ml d'acide acétique cristallisable et on sature par 250 ml d'eau distillée.

La révélation se fait dans les mêmes conditions que précédemment ainsi que la fixation.

§ 3 . A c i d i t é d e t i t r a t i o n .

Mode opératoire. 10 ml de vin ou de moût sont placés dans un erlenmeyer de 250 ml. L'indicateur employé est le phénolphthaléine à 1 % dans l'alcool (15 gouttes). On titre par la soude NaOH N/5 jusqu'à apparition d'une coloration rose.

N.B. Pour les moûts en fermentation, ou les vins contenant encore de fortes quantités de gaz carbonique, une dégazéification est effectuée avant prise d'essai, par agitation sous vide à froid durant 3 minutes.

§ 4 . Acidité volatile .

Principe.

Déplacement des acides volatils par la vapeur d'eau exempte de CO_2 . Cette vapeur est rectifiée sur colonne de VIGREUX.

Appareillage.

Nous nous sommes inspirés de la technique CAZENAVE-FERRE que nous avons modifiée pour être en accord avec les principes de JAULMES (198) et la CONVENTION INTERNATIONALE POUR L'UNIFICATION DES METHODES D'ANALYSES ET D'APPRECIATION DES VINS (199). Le barboteur employé est le type CAZENAVE-FERRE. Il est monté sur une fiole cylindro-conique de fourneau d'une capacité de 1000 ml, fournissant la vapeur d'eau. Le bouchon raccordant le générateur de vapeur au barboteur, est muni d'un petit robinet (DUJARDIN-SALLERON) servant de purge. Au dessus du barboteur nous avons monté une colonne de VIGREUX en verre d'une longueur de 55 cm entre pointes extrêmes, qui rectifie les vapeurs pour en retenir l'acide lactique. Ces vapeurs passent ensuite dans un réfrigérant à boules, d'où l'on reçoit le distillat.

Mode opératoire.

Le chargement du générateur de vapeur s'effectue avec de l'eau de chaux très limpide (300 ml). Le vin préalablement décarboniqué par agitation sous vide à froid est placé dans le barboteur. On ajoute au vin 0,5 g environ d'acide tartrique pour déplacer l'acide acétique salifié. On chauffe le robinet de purge étant ouvert; dès l'ébullition on ferme ce dernier et on ouvre l'eau de refroidissement sur le réfrigérant. Le distillat est reçu dans de l'eau distillée neutralisée en présence de phénolphtaléine. On recueille 12 fois le volume initial (125 ml pour 10 ml de prise d'essai). On titre par NaOH N/10. soit n ml.

Après ce premier titrage de l'acidité volatile brute, on repasse en milieu acide par une goutte de HCl pur. On titre en présence d'empois d'amidon, et avec l'iode N/100; le SO_2 du distillat soit n' ml.

Calcul.

Pour une prise d'essai de 10 ml de vin on a :

$$\text{Acidité volatile corrigée} = 0,49 \left(n - \frac{n'}{10} \right) \quad \text{exprimée en g/L } \text{H}_2\text{SO}_4$$

Cette technique et ce matériel fournissent une analyse très précise; la présence de CO_2 dans le distillat étant évitée, le virage est net.

B) Sucres .

Les sucres réducteurs sont déterminés par la méthode de décoloration de la liqueur de FEHLING.

Dans le cas des moûts, on travaille sur une dilution de 5 ml de moût dans 200 ml d'eau (soit 1/40), avec 10 ml de sol.A et 10 ml de sol.B de liqueur de FEHLING correspondant à 50 mg de glucose. Pour les vins, avant détermination, on traite au noir animal et on filtre sur filtre à plis.

C) Azote .

§ 1. Azote total .

La méthode est celle de KJELDAHL, avec cette particularité que le distillat est recueilli dans l'acide borique. La préparation des échantillons est la suivante:

10 ml de vin ou de moût sont placés dans un matras à long col de 300 ml. On porte à l'étuve à 70°C une nuit. L'extrait sirupeux ainsi obtenu est minéralisé sous hotte par ébullition avec 20 ml d' H_2SO_4 R.P, quelques gouttes de mercure formant catalyseur. Après minéralisation on transvase dans un ballon à distiller de 1000 ml. On précipite le mercure par 10 ml d'une solution à 20% d'hyposulfite de sodium. A ce moment on branche l'appareil, l'extrémité du tube fixé au réfrigérant plonge dans 20 ml d'acide borique à 40 o/oo placés dans un erlenmeyer de 300 ml. Avant de commencer à chauffer on ajoute par un petit tube de verre, 100 ml de lessive de soude dans le ballon de distillation.

On titre ensuite par H_2SO_4 N/100 en présence de vert de bromocrésol comme indicateur.

Pour vérifier si cette réduction de volume à l'étuve n'entraîne pas de pertes d'azote, nous avons repris ces dosages en préparant nos échantillons comme ci-dessous:

10 ml de vin ou de moût sont placés dans un matras à long col de 300 ml avec 20 ml d'acide sulfurique pur (pour toxicologie) et quelques gouttes de mercure. Par l'addition d'acide sulfurique dès le départ, on bloque tout l'azote sous forme de sulfate. On place ensuite à l'étuve à 70°C pendant une nuit, puis on chauffe cet extrait sirupeux sous la hotte. Il faut bien surveiller le début de l'attaque car une abondante mousse à ten-

dance à se former si on chauffe trop brutalement le matras; il faut donc placer à feu très doux pour éviter tout débordement. Ensuite on transvase comme précédemment dans un ballon à distiller de 1000 ml, puis on précipite le mercure.....

La première et seconde méthodes de préparation des échantillons nous ont donné strictement les mêmes résultats à 1 mg près d'azote (sur 200 mg en moyenne).

L'avantage de la première méthode est d'éviter la formation de mousse.

§ 2. Azote minéral.

On distille 25 ou 50 ml de vin ou de moût avec un excès de magnésium. On recueille le distillat dans l'acide borique à 40 o/oo et on titre comme précédemment par H_2SO_4 N/100 en présence de vert de bromocrésol comme indicateur.

D) Matières tannoïdes, polyphénols.

§ 1. Indice de permanganate.

Nous avons utilisé la méthode de RIBEREAU-GAYON et MAURIE (200) publiée dans "Analyse et Contrôle des vins" de RIBEREAU-GAYON et PEYNAUD (201). Comme l'indiquent les auteurs (201) cette méthode est une modification de la méthode NEUBAUER-LÖWENTHAL qui avait été améliorée en 1921 par FRESSENIUS et GRUNHUT (202).

On fait agir le vin à étudier sur une solution de permanganate en présence de carmin d'indigo. La solution de KMnO_4 est au titre de N/100. L'indicateur est préparé à partir d'une solution à 3 g par litre de carmin d'indigo. On prend 50 ml de cette solution avec 50 ml d' H_2SO_4 au tiers et on complète à un litre avec de l'eau distillée.

Pour le titrage à blanc on prépare une solution à 5 g/L d'acide tartrique neutralisée à moitié et contenant 10 % d'alcool.

Mode opératoire.

Dans un bécher (ou dans une capsule de porcelaine blanche) on place 50 ml de la liqueur de carmin d'indigo acide, et 2 ml du vin à analyser. On titre par KMnO_4 N/100 jusqu'à apparition d'une coloration jaune; soit n le nombre de millilitres utilisés pour cette première réaction.

Dans les mêmes conditions (vitesse d'affusion du permanganate égale à la première fois) on fait agir 2 ml de la solution tartrique, en présence de 50 ml de carmin d'indigo acide, soit n' le nombre de millilitres de KMnO_4 utilisés; le calcul nous donne:

$$\text{indice de permanganate} = 5 (n - n')$$

ou encore: teneur en polyphénols exprimée en milliéquivalents

$$5 (n - n')$$

si on préfère s'exprimer en g/l de tanin, on aura:

$$\text{tanin en grammes/litre} = \frac{n - n'}{5}$$

§ 2. Test de polyphénols.

C'est une méthode rapide de de détermination du taux de polyphénols. Par sa technique, les auteurs SCHANDERL et STANDEMAYER (203) lui on donné le nom de "test de pH 7".

Le principe est le suivant: au moyen de potasse ou de soude, on abaisse l'acidité d'un vin jusqu'à pH 7. Cette opération est contrôlée par un pH mètre muni d'un agitateur électromagnétique. (voir figure 13). Les vins riches en polyphénols se colorent en gris allant jusqu'au violet-noir. Plus l'intensité de la couleur est grande, plus la teneur en polyphénols est élevée.

Ce procédé de comparaison rapide nous a rendu service. Il est bon de le faire suivre d'un titrage au permanganate.

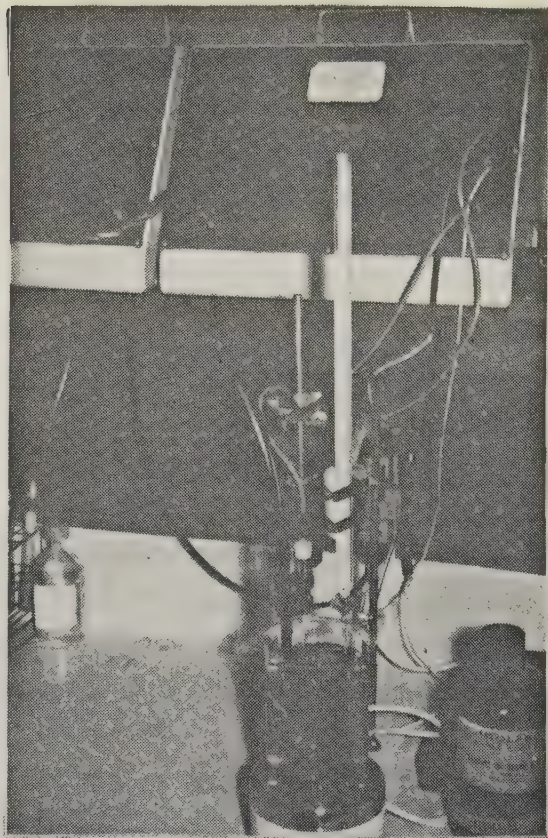


Fig.13

E) Fer.

Le principe de détermination est celui de FERRE et MICHEL(204). Personnellement nous avons procédé comme suit: le dosage est fait dans un bloc de WALPOLE et avec des tubes de verre de 12 X 120.

Dans 2 tubes A et B on place 10 gouttes d'acide chlorhydrique au 1/2 dans chacun. On ajoute ensuite dans A, 5 ml de vin. Chacun des tubes reçoit ensuite 4 gouttes d'eau oxygénée à 10 vl, 2,5 ml d'une solution de sulfocyanure de potassium à 10 %. Une coloration apparaît dans le tube A, c'est la réaction du fer total avec le thiocyanate de potassium; en effet le fer complexé a été déplacé par HCl et le tout oxydé par H_2O_2 .

On laisse alors tomber dans le tube B, la liqueur titrée de fer

à 50 mg/L, jusqu'à obtention d'une coloration égale à celle du tube A. Dans le tube B, on intervertit des additions de liqueur et d'eau distillée, de façon à avoir dans A et B des colorations égales avec des niveaux de liquides égaux. Pour plus de précision et pour compenser la coloration jaune due au vin, on place dans le bloc de WALPOLE, un tube d'eau distillée derrière le tube A et un tube de vin (acidifié par 10 g HCl) derrière le tube B.

Par le nombre de millilitres de liqueur de fer versés dans le tube B, on obtient la teneur en fer total en mg/L, soit n le volume de liqueur en ml; on:

$$n \times 10 = \text{fer en mg/l}$$

F) Matières pectiques.

Nous avons utilisé avec succès la méthode décrite par JAULMES (198) dans son traité. Nous avons réalisé ainsi la détermination de la somme pectine + gommés. Cent millilitres de vin sont additionnés de 1 ml d' HCl pur. On ajoute ensuite de l'alcool absolu pour amener le titre du mélange à 80 °, soit dans notre cas 600 ml. On agite et ensuite on laisse reposer 24 h au minimum, nous avons préféré porter ce délai à 4 jours. Nous avons alors filtré sur double filtre taré (DURIEUX bande bleue) et après lavage à l'alcool, le filtre et son précipité ont été pesés à la balance de précision.

G) Anhydride sulfureux.

§ 1. Anhydride sulfureux libre.

La méthode la plus courante est celle de RIPPER: 50 ml de vin sont acidifiés par 1 ml d' H_2SO_4 au 1/3, on titre par l'iode N/50 en présence d'empois d'amidon.

§ 2. Anhydride sulfureux total.

La méthode simplifiée de RIPPER nous a donné des chiffres d'une précision suffisante: Dans un erlenmeyer bouchant émeri, on place 50 ml de vin et 25 ml de potasse N, on bouche et après agitation on laisse agir 15 minutes pour libérer l'anhydride sulfureux de ses combinaisons. Après ce temps on acidifie par 15 ml d' H_2SO_4 au 1/5 (en vol.). On titre en présence d'empois d'amidon, avec une solution d'iode N/50.

N.B. L'anhydride sulfureux combiné est obtenu par différence entre le total et le libre.

H) Microscopie.

§ 1. Examens généraux.

Les examens généraux sont effectués directement sur moût ou vin entre lame et lamelle.

§ 2. Numérations cellulaires.

Nous avons utilisé pour ce travail le compte-levures du Pr PERARD ,modèle NACHET; en procédant de la façon suivante: 5 ml de moût, prélevés après brassage du bocal de fermentation, sont placés dans une fiole jaugée de 100 ml. On complète au trait de jauge avec 95 ml d'iode N/10 et on agite violemment. Aussitôt on prélève 1 ml de ce mélange que l'on place sur la lame du compte-levure, on ferme celui-ci en faisant glisser avec précaution la lamelle à face parallèle et en évitant les bulles d'air. On centre l'appareil avec le grossissement 10 X 12,5 soit 125 et on compte les micro-organismes sous le grossissement de 40 X 12,5 soit x 500.

I) Mesures électrometriques: pH ; rH ; oxydo-réduction.

Ces mesures sont faites sur le potentio-pH-rH-mètre QUERE type 50 (Fig I4, I5, I6). Cet appareil permet en outre, la mesure du rH par lecture directe au cadran, sans calculs. Avant chaque mesure, l'électrode de platine est lavée à l'acide chlorhydrique pur, rincée à l'eau distillée et flambée ensuite sur une lampe contenant de l'alcool pur. Les autres électrodes

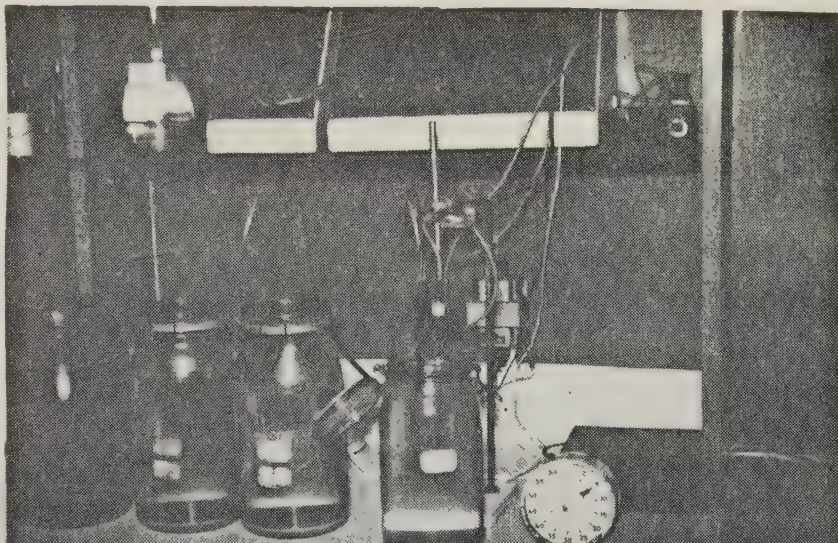


Fig. 14

sont simplement lavées à l'eau distillée avant usage, puisqu'elles plongent dans ce liquide en dehors des périodes de travail.

Les mesures sont facilitées par l'emploi de flacons à très large ouverture. Après essais, nous avons remarqué qu'il était indispensable de laisser un temps de 5 minutes entre l'immersion des électrodes et les lectures. Pour le potentiel d'oxydo-réduction, les valeurs sont données en millivolts soit par rapport à l'électrode au calomel saturé : E_C ; soit par rapport à l'électrode à hydrogène Normale : E_H ; mais dans la généralité, les potentiels Redox de notre travail seront codifiés selon la première expression.

J) Alcool.

§ 1. Vins.

Dans le cas qui nous intéresse ici, la méthode ébulliométrique avec double mesure et surveillance de la pression barométrique, était suffisante. Pour plus de précision, le chauffage de l'appareil était

assuré par un bec spécial au propane.

§ 2 . Moûts .

Dans notre étude, les premières formations d'alcool par les moûts nous intéressaient peu, cependant certaines mesures furent effectuées par la méthode des différences de température. (entre le point d'ébull. de l'eau et le point d'ébull. du moût). Le chiffre d'écart constaté entre les deux lectures au thermomètre est reporté sur une table spéciale (205).

2) MATERIEL .

A) Appareillage .

Pour l'étude de nos fermentations et dégradations biologiques, nous avons utilisé des récipients à large ouverture permettant de suivre l'évolution d'un échantillon et d'effectuer les mesures électrométriques nombreuses. Comme le montrent les figures I5 et I6, ces flacons furent du type baril de 5000 ml et bocaux à large col de 3000, 2000, 1500 et 1000 ml. Pour les études de fermentation comportant un très grand nombre de tests vérifiés uniquement par chromatographie, nous avons pu utiliser des fioles jaugées de 100 ml; ce qui permit un grand nombre d'études à la fois (20 à 40) et qui limitait le volume du prélèvement total. Dans les essais "B", l'influence de la lumière était éliminée en



Fig. I5



Fig. I6

protégeant les barils de 5 litres par un carton ondulé étanche sur la circonférence et sur le couvercle.

Pour empêcher l'oxydation des moûts et aussi celle des vins, nous avons recouvert la partie supérieure de ces liquides, d'une couche de un centimètre d'huile de vaseline neutre. Cette protection ne gêne pas le dégagement de gaz carbonique ni les mesures électrométriques. Cette précaution contre l'oxydation ne fut pas prise pour les essais "B".

Les expériences au plan viticulture, furent menées dans les récipients vinaires traditionnels de la région, à savoir: barriques de 225 l, tonnes de 600 l, foudres en bois ou cuves verrées de 50 hl à 250 hl de capacité.

B) Prélèvements.

Les prélèvements de moût pour études de laboratoire furent exécutés dès la sortie du pressoir et apportés aussitôt sur les tables de travail. Nous étions donc dans les mêmes conditions qu'au chai, puisque dans la région qui nous intéresse, les Muscadets et Gros-Plant sont entonnés à ce stade; bien entendu avant de procéder à ce travail on attend que tous les serrages et le jus de goutte soient homogénéisés dans la cuve située sous le pressoir et c'est dans ces conditions que nous-mêmes avons effectués nos prélèvements. Par contre pour les recherches sur le pressurage, les jus des différents serrages étaient fractionnés; nous trouverons le développement de ces essais dans la partie du texte qui leur est réservée.

Les essais viticoles, c'est à dire en grand volume, ont été réalisés dans les chais des vignerons, sans aucune condition spéciale préalable, si ce n'est l'emploi des produits justifié par notre technique spéciale de vinification.

Enfin dans notre texte, on trouvera des travaux spéciaux comme l'étude de propriétés antibiotiques; le développement du protocole expérimental dans ce cas, se trouve dans le chapitre traitant de cette question.

C h a p î t r e 3

H i s t o r i q u e

d e s

t r a v a u x p e r s o n n e l s

En 1959 nous commençons des travaux expérimentaux dans les chais de vinification, et grâce à l'amabilité de viticulteurs, nous pouvons réaliser des tests de facteurs activateurs et inhibiteurs de la fermentation alcoolique, ou de la fermentation malolactique. Les essais, au nombre de 37, comportaient des additions de produits seuls ou groupés, ajoutés avant ou pendant la fermentation alcoolique. L'évolution de cette dernière et sa date de départ étaient notées en comparaison de l'échantillon témoin. De ce premier 'défrichage' certains paramètres furent mis en relief, citons parmi eux: le phosphète d'ammoniaque, l'anhydride sulfureux, le tanin C'est en partant de ces éléments que furent commencés les tests des années suivantes.

En 1960 des doses variables des facteurs précités nous fournissent une orientation générale, bien que pris séparément leur action sur le ralentissement du phénomène malolactique est nulle. Par exemple, dans plusieurs essais comprenant un apport de tanin seul, nous remarquons qu'il

n'y a aucun effet inhibiteur, pas plus que dans des séries comprenant anhydride sulfureux et tanin. Dans des expériences réalisées avec apport de phosphate d'ammoniaque et faible dose d'anhydride sulfureux, nous observons un déclen-

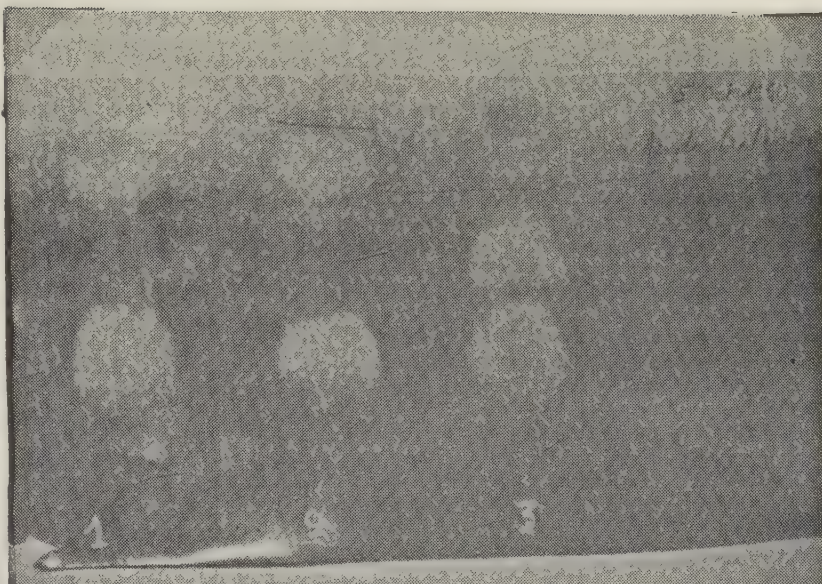


Fig. 17

chement malolactique normal. Dans d'autres séries expérimentales, nous constatons que malgré des valeurs différentes de ces deux derniers facteurs, on ne change pas beaucoup leurs effets sur le moût; mais comme pour la vinification des Muscadets et Gros-Plants un apport de tanin est indispensable, certains de nos tests comprenaient ces trois facteurs réunis; nous nous sommes aperçus alors que nous obtenions un ralentissement à la rétrogradation. Cette première observation a d'ailleurs été fixée dans le chromatogramme que nous montre la figure 17, l'échantillon traité est le N°3.

Aux vendanges 1961 les expériences se poursuivent avec confirmation de l'action synergique de nos éléments. Au cours de l'année 1961 nous étudions les quantités maximales et minimales de ces produits, pour les adapter à notre région particulière de vinification et pour tenir compte aussi de leurs effets possibles sur la dégustation. Par l'expérience que nous avons dans ce vignoble, nous avons pu limiter certains paramètres. Par exemple le tanin de noix de galle est le seul employé pour la vinification des Muscadets et Gros-Plants, car le tanin de chataigner laisse un goût très désagréable au vin, après fermentation. Les doses courantes de tanin de noix de galle, sont de 15 à 25 g/hl dans la région. L'anhydride sulfureux lui, n'est pour ainsi dire pas utilisé, ce qui est logique compte tenu de son action inhibitrice sur les levures; action d'autant plus marquante du fait des basses températures enregistrées en général au moment des vendanges et de la mauvaise protection des celliers de notre vignoble contre la fraîcheur des nuits. Nos constatations personnelles

nous ont montré qu'une valeur de 40 à 45 mg/l SO_2 était un seuil à ne pas dépasser si on veut éviter des fermentations alcooliques qui ne se terminent qu'en Avril ou Mai; (alors que la mise en bouteilles de ces vins frais se fait au mois de Mars qui suit les vendanges). Enfin pour les composés ammoniacaux aucune expérience régionale nous a été utile, ces préparations n'étant pas employées à la vendange dans notre région. Avec ces composés azotés nous avons surtout voulu obtenir une prolifération maximale de la levure de façon à faire jouer le plus possible l'antagonisme levures-bactéries. Or nous savons que ce ne sont pas les doses les plus importantes de cet élément qui fournissent les meilleures courbes densimétriques de fermentation. La dégustation, là aussi, limite la quantité de produit à employer.

De 1962 à 1965 des essais très précis de laboratoire sont mis en route pour approfondir le phénomène malolactique et pour trouver l'explication biochimique des résultats que nous obtenons et qui donne si grande satisfaction aux viticulteurs, c'est le corps même de notre travail que nous allons développer dans le chapitre cinquième : " Recherches et Travaux personnels de laboratoire".

Avant d'exposer notre étude, il nous a semblé préférable de placer ici, un résumé de l'application pratique de notre technique spéciale de vinification, montrant bien les résultats importants obtenus et l'intérêt croissant qui y est porté.

Chapître 4

**Evolution de l'application
pratique à la viticulture
de notre technique
de fermentation**

1961. L'année 1961 a été consacrée à la confirmation de nos essais poursuivis en 1959 et 1960, nous les avons étendus sur des cuves de 50 hl à 150 hl, ainsi que sur des fûts, en différents points du vignoble. L'ensemble représente un volume de 1600 hl.

1962. Les résultats encourageants obtenus en 1961 ont permis de porter le volume de traitement des moûts à 9000 hl. Nous avons remarqué qu'il est indispensable de réaliser cette technique dès la sortie du pressoir, avant tout départ de fermentation alcoolique.

Chez des viticulteurs dont les vins rétrogradaient à chaque vendange ou au cours de leur conservation et depuis plusieurs années consécutives, nous avons pris la précaution de faire nettoyer les fûts, les cuves et le matériel vinaire à l'eau bouillante; car nous avons constaté que le déclenchement malolactique était de plus en plus fréquent si on accumulait les ensemencements d'une année à l'autre. Cependant cette précaution de lavage à elle seule n'est pas suffisante pour entraver la désacidification biologique, les moûts contenant toujours suffisamment de bactéries lactiques provenant des raisins.

I963. A la fin de nos essais de I962, l'équilibre entre les facteurs semble trouvé puisque les résultats sont excellents. Notre conduite de vinification est appliquée à 54.000 hl par 450 viticulteurs environ. Dans chaque moût traité de cette façon nous obtenons une immobilisation de l'acide malique; alors que par ailleurs la fréquence de la fermentation malolactique augmente d'année en année dans le vignoble Nantais. Nous en avons fait la remarque dans seconde partie de cet ouvrage, premier chapitre, I°), sixième alinéa

I964. Les dégustations et comparaisons effectuées par les vigneronnismes, les succès qu'ils remportent aux différents concours avec des vins élaborés selon notre technique; permettent d'employer notre méthode sur 70.000 hl environ.

I965. Cette vinification selon notre procédé s'étend de plus en plus par la satisfaction des viticulteurs et par les résultats qu'elle fournit. Certains vigneronnismes incrédules au départ, ont souvent alterné dans leur chai des foudres traités selon notre méthode avec des foudres du même moût en vinification traditionnelle. Une fois la fermentation alcoolique terminée, les premiers étaient facilement reconnaissables par leur limpidité, et leur brillant, augmentés d'une fraicheur de bouquet, (inhérente au bas potentiel d'oxydo-réduction obtenu par notre technique). Le volume total de moût vinifié selon nos directives, aux vendanges I965; représente alors plus de 90.000 hl, répartis dans toutes les contrées du vignoble.

Enfin nous savons que notre vinification spéciale serait fort intéressante pour la région du Cognac, où l'on cherche à éviter absolument la fermentation malolactique pour des raisons de distillation que nous avons développées précédemment.(voir LAFON (I63) page 88).

Dans le vignoble de Savoie, on craint aussi beaucoup cette rétrogradation de l'acide malique, ce qui fournirait une troisième zone d'application en France.

A l'étranger, et plus particulièrement pour l'élaboration des vins de Jerez, la désacidification biologique est redoutée, TZYB (205 bis) a précisé que cette dernière avait un rôle défavorable sur la formation du voile.

Chapitre 5

R e c h e r c h e s

&

travaux personnels

de laboratoire

1) ETUDES D'ORIENTATION.

A) Essais "W."

Les premiers travaux de laboratoire de 1962 sont guidés, comme nous pourrions le constater, par les tests pratiques des années précédentes.

Au cours de ces expériences les volumes d'essais utilisés furent de 300 ml, ils portèrent sur un moût dont les caractéristiques analytiques étaient les suivantes:

Densité à 15°C.....1062
Alcool acquis.....0°62 % en vol.
Sucres réducteurs.....142,80 g/l
Acidité totale.....5,80 g/l en H₂SO₄
Alcool en puissance.....8°30.

Si les essais sont encore très succincts, puisque nous sommes au début de nos recherches, il est bon cependant de les présenter ici, ne serait-ce que pour mettre en relief la facilité avec laquelle le déclenchement malolactique s'effectue.

Sur le moût caractérisé par les chiffres précédents, nous avons effectué les additions suivantes:

W₁....Moût brut,tel.

W₂....Moût brut + addition de 150 mg/l tanin noir de galle.

37,5 mg/l SO₂

100 mg/l phosphate di-ammonique.

W₃....Moût brut + addition de 150 mg/l tanin de noix de galle.

37,5 mg/l SO₂

W₄....Moût brut + addition de 150 mg/l tanin de châtaigner

37,5 mg/l SO₂

100 mg/l phosphate di-ammonique.

W₅....Moût brut + addition de 150 mg/l tanin de châtaigner.

37,5 mg/l SO₂

W₆....Moût brut + addition de 150 mg/l tanin de noix de galle.

100 mg/l phosphate di-ammonique.

Toutes ces préparations furent ajoutées avant départ de fermentation alcoolique. Ce dernier est quasi total au 2^{ème} jour pour les échantillons; les plus lents évoluant au plus tard dès le 3^{ème} jour.

Les surveillances chromatographiques effectuées tous les deux jours, nous apportent une évolution dès le 25^{ème} jour après le départ de fermentation alcoolique. La figure I8 nous montre un chromatogramme à ce stade. La fermentation malolactique est déjà achevée pour W₁; les

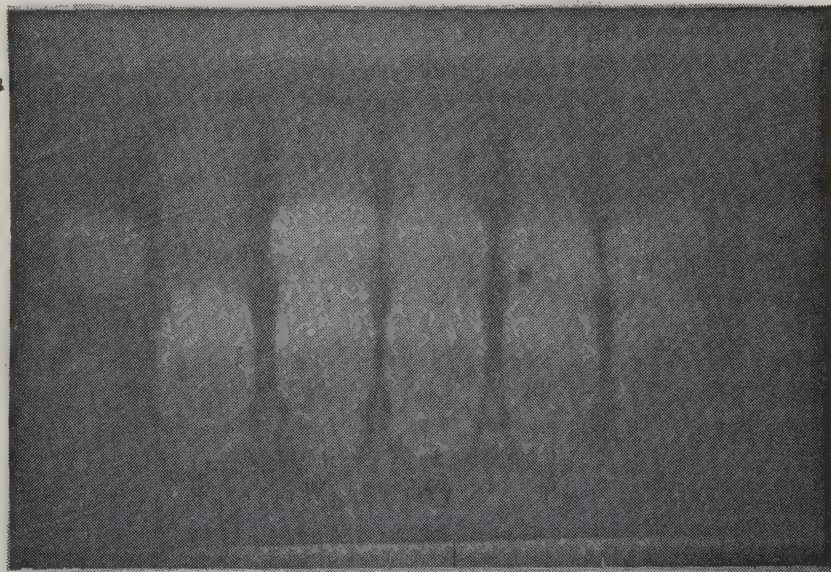


Fig. I8

5 autres échantillons n'ayant pas évolué. Par contre deux mois environ après le départ de fermentation alcoolique, soit exactement au 74^{ème} jour,

on peut noter une disparition de l'acide malique, par rétrogradation, pour certains flacons, par exemple W_3 et W_4 en plus de W_1 .

L'imperfection de cette expérience par manque de coordonnées précises fait cependant ressortir l'effet ralentisseur de certains facteurs, (effet à améliorer, certes) ainsi que la propension de nos vins à la rétrogradation malolactique.

Le même effet ralentisseur est applicable aussi dans d'autres jus, et pour bien montrer la polyvalence de notre technique, nous avons procédé à des essais sur cidre qui se sont montrés satisfaisants.

B) Essais "X".

Les caractéristiques du jus de pommes étaient les suivantes:

Densité à 15°C.....1049

Acidité totale.....5,20 g/l. en H_2SO_4 .

Les flacons étant marqués de X_1 à X_5 on leur appliqua aussitôt:

X_1 jus de pommes brut.

X_2 jus de pommes brut + addition de 150 mg/l tanin noix de galle.

X_3 jus de pommes brut + addition de 150 mg/l tanin de châtaigner.

X_4 jus de pommes brut + addition de 150 mg/l tanin de noix de galle
80 mg/l phosphate di-ammonique.

X_5 jus de pommes brut + addition de 150 mg/l tanin de noix de galle
80 mg/l phosphate di-ammonique
30 mg/l SO_2 .

La fermentation alcoolique est spontanée dans les échantillons. Le troisième jour de fermentation des mesures de potentiel d'oxydo-réduction nous fournissent les chiffres qui suivent:

X_1 E_o+ 125 mv.

X_2 E_o+ 115 mv.

X_3 E_o+ 106 mv.

X_4 E_o+ 100 mv.

X_5 E_o+ 75 mv.

La fermentation du lot X_5 se réalise donc dans des conditions plus réductrices que pour les autres préparations. Si l'on examine l'importance de la tache d'acide malique avec celle de l'acide lactique sur les

chromatogrammes réalisés en X_1, X_2, X_3, X_4 et X_5 , au 31^{ème} jour après la fermentation alcoolique; on peut facilement reconnaître qu'en X_5 aucune évolution malolactique n'est intervenue. La tache d'acide malique est complète comme au départ, et l'acide lactique n'est présent qu'à l'état de traces provenant de la fermentation alcoolique.

Pour obtenir un effet inhibiteur plus marqué dans le temps, il faut encore étudier l'équilibre des facteurs entre eux. D'autres séries de tests nous ont confirmé qu'une augmentation du taux de matières tanniques était souhaitable pour renforcer nos premiers résultats, mais toutefois il ne faut pas dépasser un certain seuil, car alors on obtiendrait un effet inverse de celui que nous cherchons.

2) ETUDE DE LA BIOCHIMIE DU PHENOMENE MALOLACTIQUE.

"DESCRIPTION DE NOTRE TECHNIQUE DE VINIFICATION."

A) Essais "B."

§ 1. Préliminaires.

Ces essais 'B' représentent une série sur laquelle un grand nombre de déterminations ont été réalisées.

Le volume mis en oeuvre pour chaque lot, est porté cette fois à 5.000 ml, en barils de verre. Ces derniers sont protégés de la lumière comme nous l'avons indiqué au Chapitre II, rubrique: Matériel, au paragraphe : A) Appareillage. Par contre la couche supérieure du liquide expérimental n'est pas isolée de l'air ambiant par une épaisseur d'huile de vaseline neutre comme pour les autres essais.

Les caractéristiques du moût 'B' nous ont permis de l'identifier comme suit:

pH.....	2,80
Potentiel d'oxydo- réduction..... E_C	+300 mv
Sucres réducteurs.....	193,5 g/l
Alcool acquis.....	0,15 % vol
Matières tannoïdes totales.....	0,04 g/l
Acidité volatile corrigée.....	0,195 g/l (exp. en H_2SO_4)
Anhydride sulfureux libre.....	traces
Anhydride sulfureux total.....	16,08 mg/l (exp. en H_2SO_4)

Au point de vue microbiologique, une numération du moût frais, avant tout développement de levures et bactéries, nous montre une prédomi-

minance très nette de ces dernières puisque nous avons compté:

Bactéries.....60.800 par microlitre.

Levures.....22.800 par microlitre.

Enfin le chromatogramme de la figure I9, nous fournit un éventail de la répartition des acides organiques. On peut constater facilement sur ce cliché l'importance de la tache des acides tartrique et malique de ce moût.

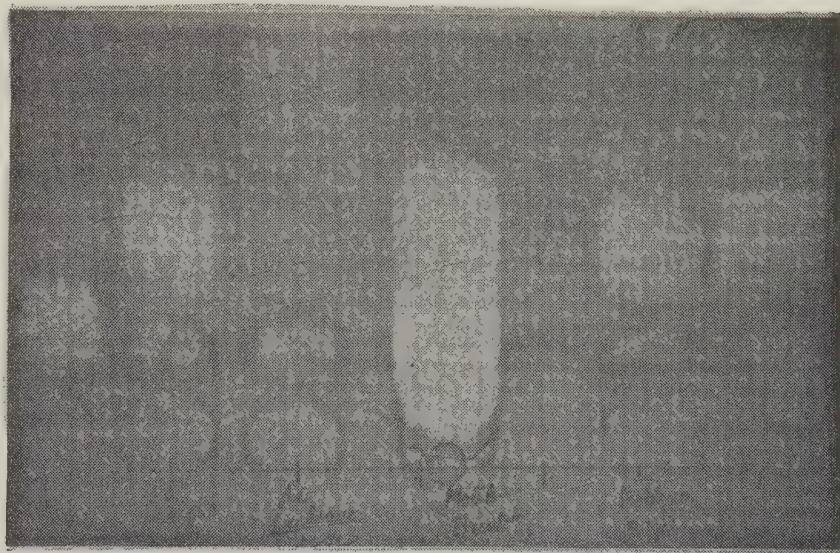


Fig.I9

Désirant pousser plus à fond le test de notre méthode de vinification, nous avons volontairement modifié certains des caractères analytiques du moût que nous venons de décrire; pour obtenir de meilleures conditions de déclenchement malolactique. C'est à dire que cette expérience est menée dans des circonstances artificielles anormales par rapport à la réalité, pour mettre en exergue notre technique et nos résultats.

Tout d'abord à l'aide de lessive de soude R.P, on porte le pH à 4,05; ce qui fournit une concentration en ions hydrogène très favorable si l'on se reporte à la bibliographie générale exposée précédemment. A cet effet on verse 250 ml de moût dans un bécher de 500 ml que l'on place sur un agitateur électro-magnétique. On immerge les électrodes du pH-mètre et à l'aide d'une burette à robinet on laisse tomber la lessive de soude jusqu'à obtention du pH désiré. Dans le cas qui nous intéresse ici, la modification nécessita 2 ml de soude pour 250 ml de moût, il fut donc facile d'interpoler ensuite ce premier chiffre au 25.000 ml représentant la totalité de nos prélèvements. Un contrôle final sur ces 25 litres après homogénéisation nous confirmait la valeur du pH cherché.

Notre expérience personnelle nous ayant montré que le déclenchement malolactique était plus fréquent dans les vins aux potentiels d'oxydo-réduction élevés, nous avons volontairement augmenté la valeur de ce dernier dans notre moût expérimental, par addition d'eau oxygénée à 10 volumes. Le chiffre initial de $E_C + 300$ mv a donc été porté à $E_C + 360$ mv. Nous avons procédé pour cette seconde correction de la même manière que pour le pH, c'est à dire, calcul de la quantité à ajouter par électrotitrimétrie au pH-rH-mètre; puis extrapolation sur les 25.000 ml avec contrôle final sur ce dernier volume.

Les caractéristiques deviennent alors:

pH.....	4,05
Potentiel d'oxydo-réduction.....	$E_C + 360$ mv
Sucres (inchangés).....	193,5 g/l
Alcool acquis (inchangé).....	0°15 % vol.
Alcool en puissance.....	11°38 % vol.
Alcool total futur.....	11°53 % vol.
Matières tannoïdes totales (inchangées)....	0,04 g/l
Acidité totale.....	3,40 g/l (exp en H_2SO_4)
Acidité volatile corrigée.....	0,195 g/l (exp en H_2SO_4)
Anhydride sulfureux libre.....	traces
Anhydride sulfureux total.....	16,08 mg/l (exp en H_2SO_4)

Les 25.000 ml de moût ainsi caractérisés sont répartis dans 5 barils de 5.000 ml chacun. On procède alors à la préparation des essais:

- B₁.....Moût tel.
- B₂.....moût tel + addition de 250 mg/l tanin noix de galle.
- B₃.....moût tel + addition de 250 mg/l tanin noix de galle + addition de 100 mg/l phosphate di-ammonique.
- B₄.....moût tel + addition de 250 mg/l tanin noix de galle + addition de 100 mg/l phosphate di-ammonique + addition de 37,5 mg/l d'anhydride sulfureux.
- B₅.....moût tel + addition de 250 mg/l tanin de chataigner.

L'échantillon B₄ représente notre mode de vinification déduit des expérimentations antérieures.

Après ces apports d'éléments, le taux de matières tannoides totales devient:

B₁.....0,04 g /l
 B₂.....0,26 g /l
 B₃.....0,26 g /l
 B₄.....0,26 g /l
 B₅.....0,16 g /l

L'azote total varie aussi, et sa détermination nous montre bien l'apport provenant du phosphate di-ammonique.

B₁.....azote total.....626,5 mg/l
 B₂.....azote total..... d°
 B₃.....azote total.....644,0 mg/l
 B₄.....azote total.....645,0 mg/l
 B₅.....azote total.....626,5 mg/l

§ 2. Fermentation alcoolique.

C'est par le dosage des sucres réducteurs que l'on observe une activité levurienne plus importante dans l'échantillon B₄.

TENEUR EN SUCRES RESIDUAIRES AU COURS DE LA FERMENTATION ALCOOLIQUE.				
(Tableau XXXXII)				
Références.	3ème jour de fermentation alcoolique.	6ème jour de fermentation alcoolique.	11ème jour de fermentation alcoolique.	12 jour de fermentation alcoolique.
B ₁	153 g/l	64,5 g/l	10,4 g/l	5,37 g/l
B ₂	160	60,4	12,0	7,27
B ₃	163	60,0	10,8	6,56
B ₄	149	55,0	8,7	4,98
B ₅	159	65,3	11,6	6,49

Au 35 ème jour après le début de l'expérimentation, l'éventail des valeurs de sucres réducteurs s'établissait comme suit:

B₁.....I,06 g/l
 B₂.....1,11 g/l
 B₃.....I,I4 g/l
 B₄.....0,98 g/l
 B₅.....I,04 g/l

§ 3. Evolution du pH pendant la fermentation alcoolique.

Les différentes courbes que nous présentons ici, (fig 20, 21, 22, 23, 24 et 25) sont établies d'après le tableau XXXXIII résultant de nombreuses mesures; nous le reproduisons ci-dessous.

EVOLUTION DU pH DANS LES ESSAIS B ₁ B ₂ B ₃ B ₄ et B ₅ PENDANT LA FERMENTATION ALCOOLIQUE.																		
(Tableau XXXXIII)																		
Références	Epoque de la mesure, exprimée en nombre de jours écoulés après le début des essais																	
	1	3	5	7	11	14	17	27	36	54	60	70	85	96	139	174	201	229
B ₁	4,05	4,05	4,06	4,06	4,10	4,17	4,17	4,17	4,24	4,25	4,25	4,25	4,25	4,25	4,26	4,30	4,40	4,40
B ₂	4,06	4,06	4,06	4,06	4,09	4,16	4,16	4,17	4,24	4,25	4,25	4,25	4,25	4,25	4,26	4,26	4,41	4,60
B ₃	4,01	4,01	4,01	4,01	4,01	4,08	4,08	4,08	4,15	4,16	4,16	4,16	4,16	4,16	4,16	4,18	4,21	4,30
B ₄	4,00	4,00	4,00	4,00	4,01	4,05	4,05	4,06	4,14	4,15	4,15	4,16	4,16	4,16	4,16	4,18	4,18	4,25
B ₅	4,04	4,04	4,04	4,04	4,05	4,10	4,10	4,15	4,20	4,21	4,21	4,22	4,22	4,22	4,30	4,40	4,40	4,45

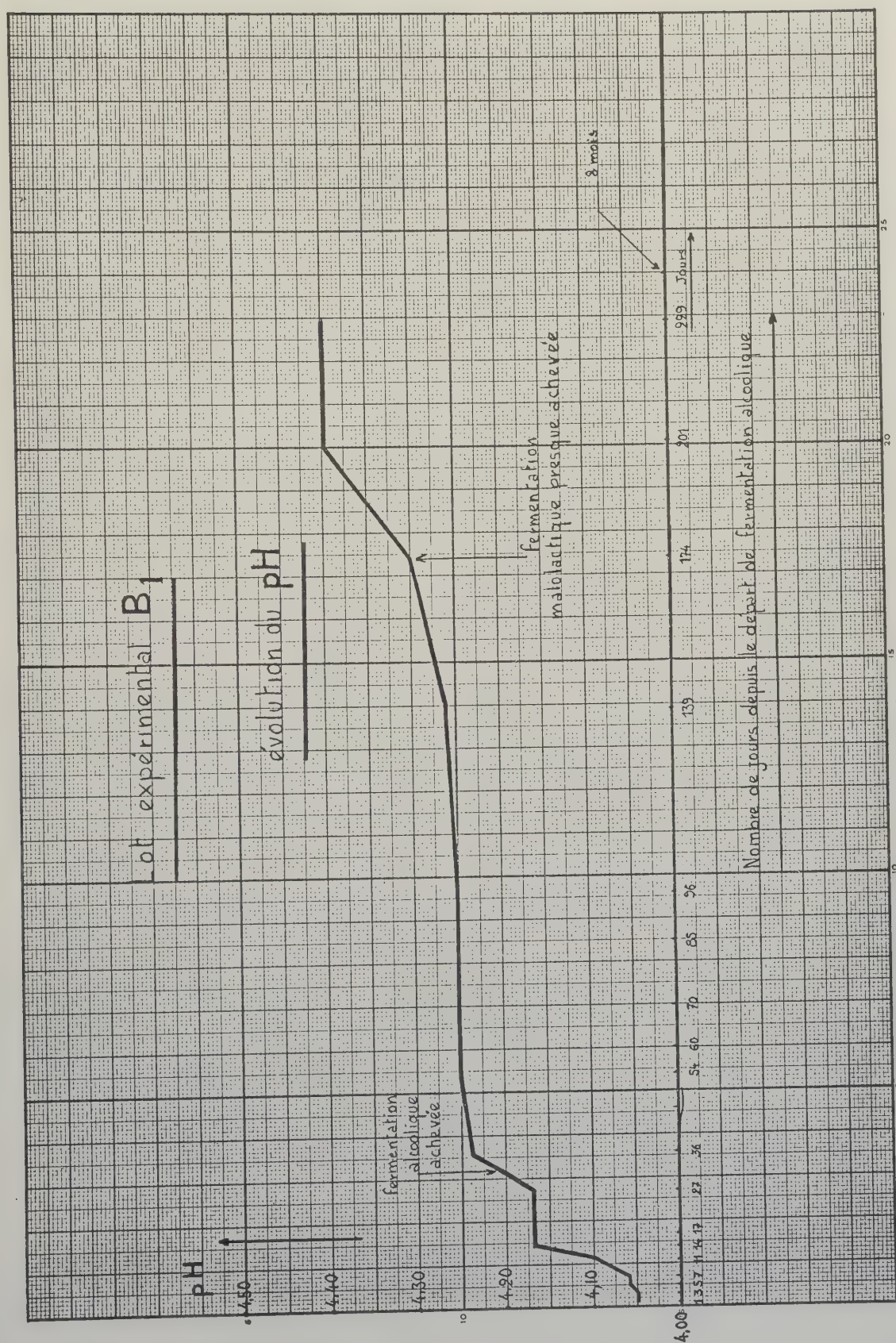


Fig 20

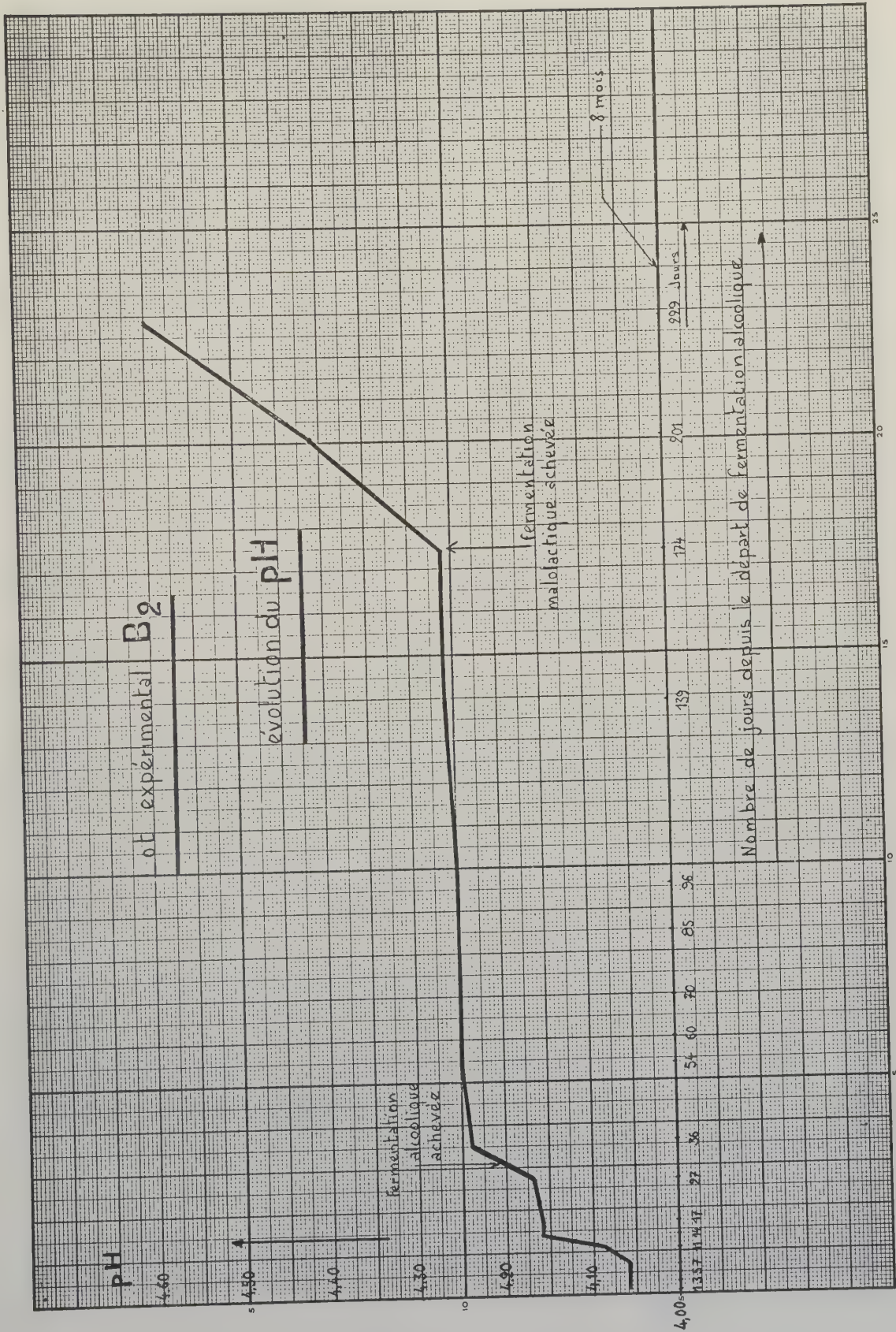


Fig 21

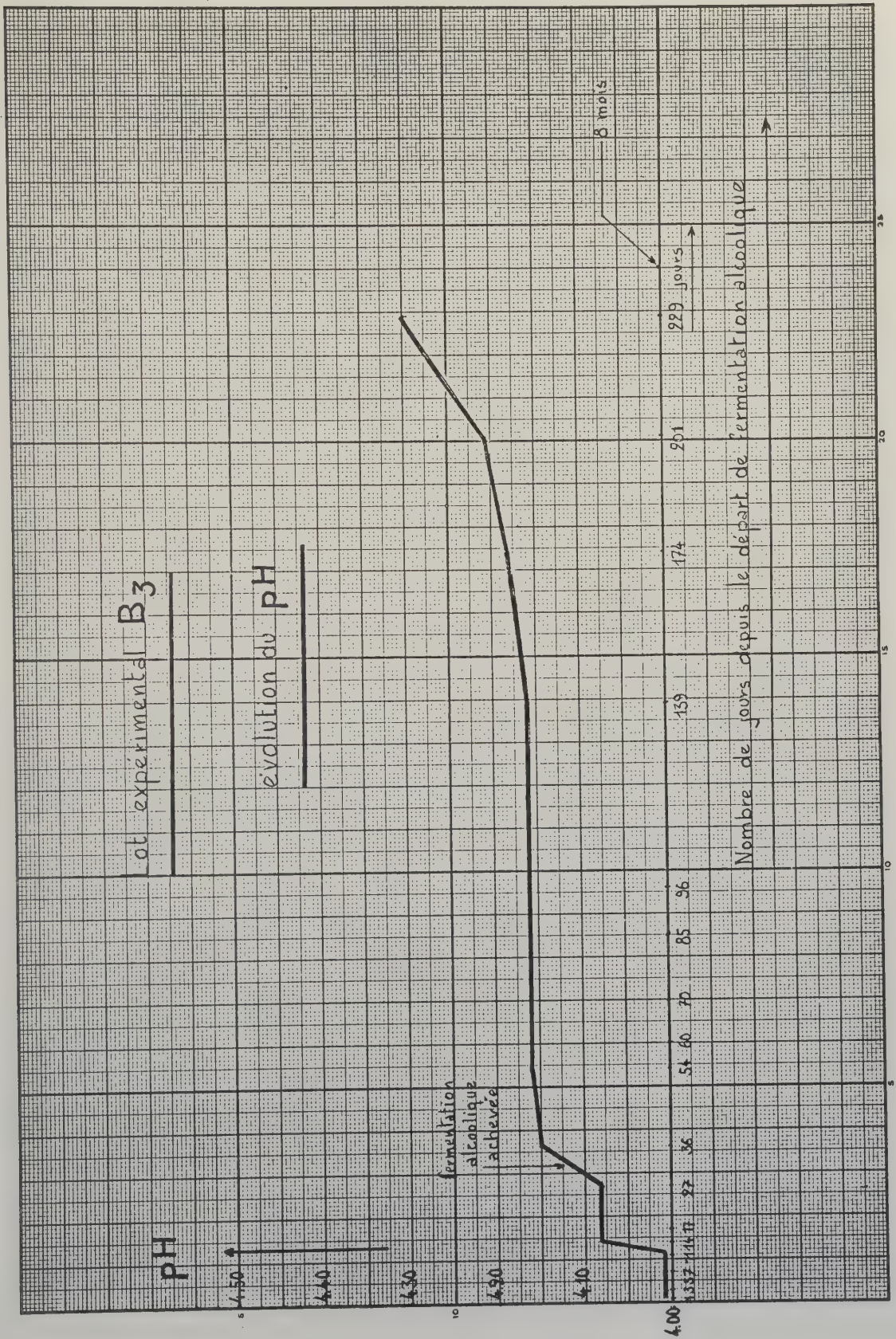


Fig 22

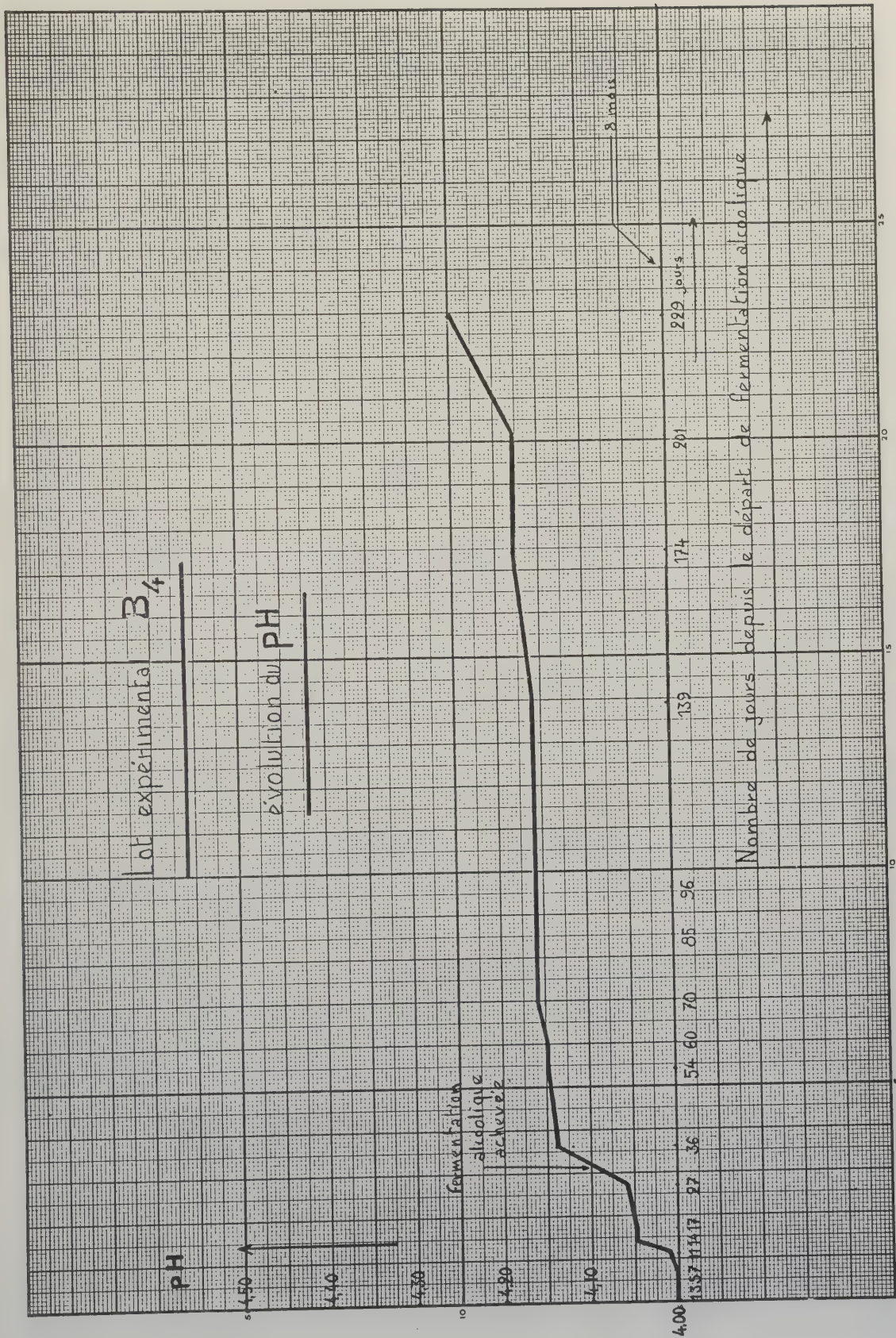


Fig 23

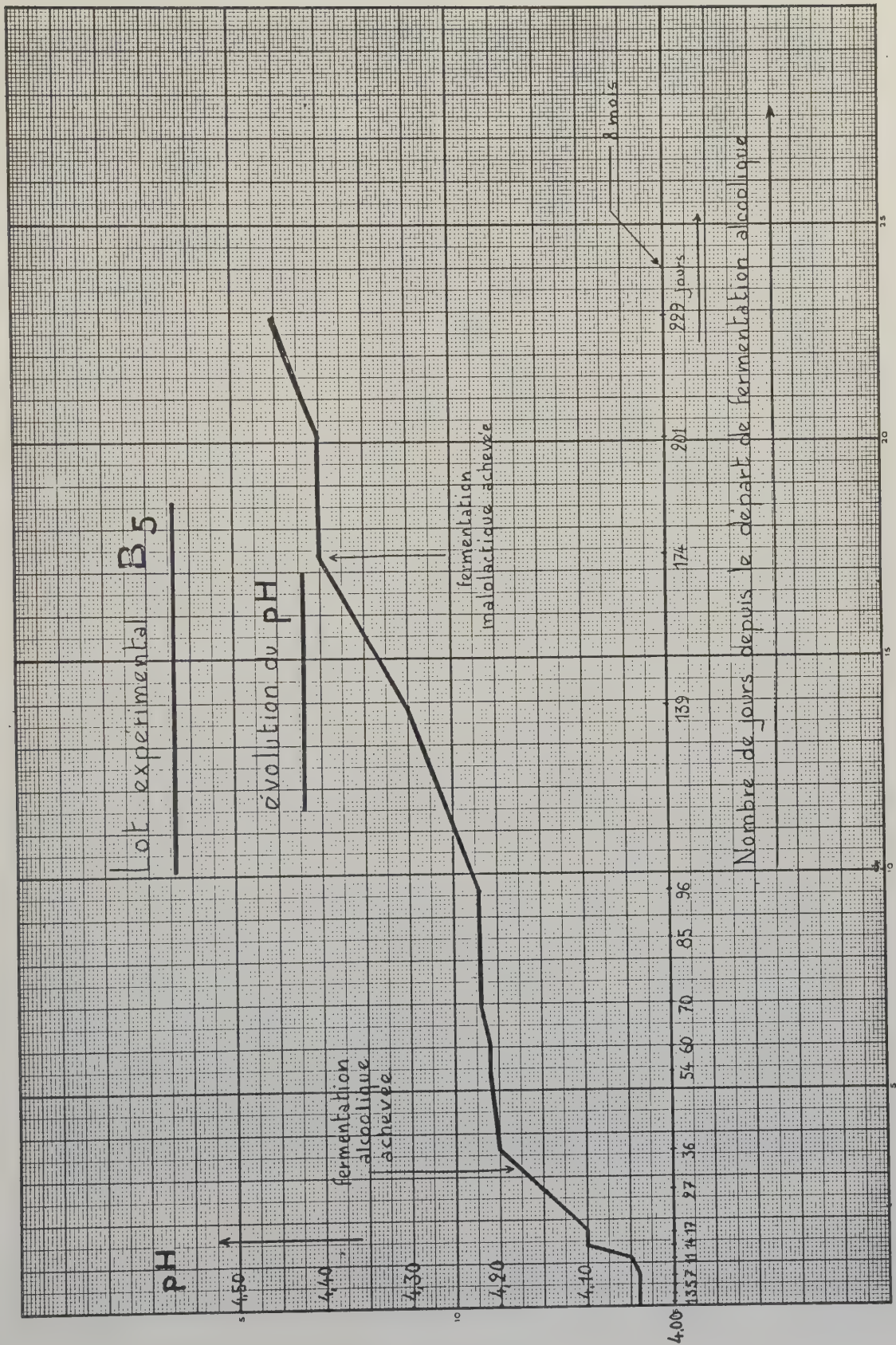


Fig 24

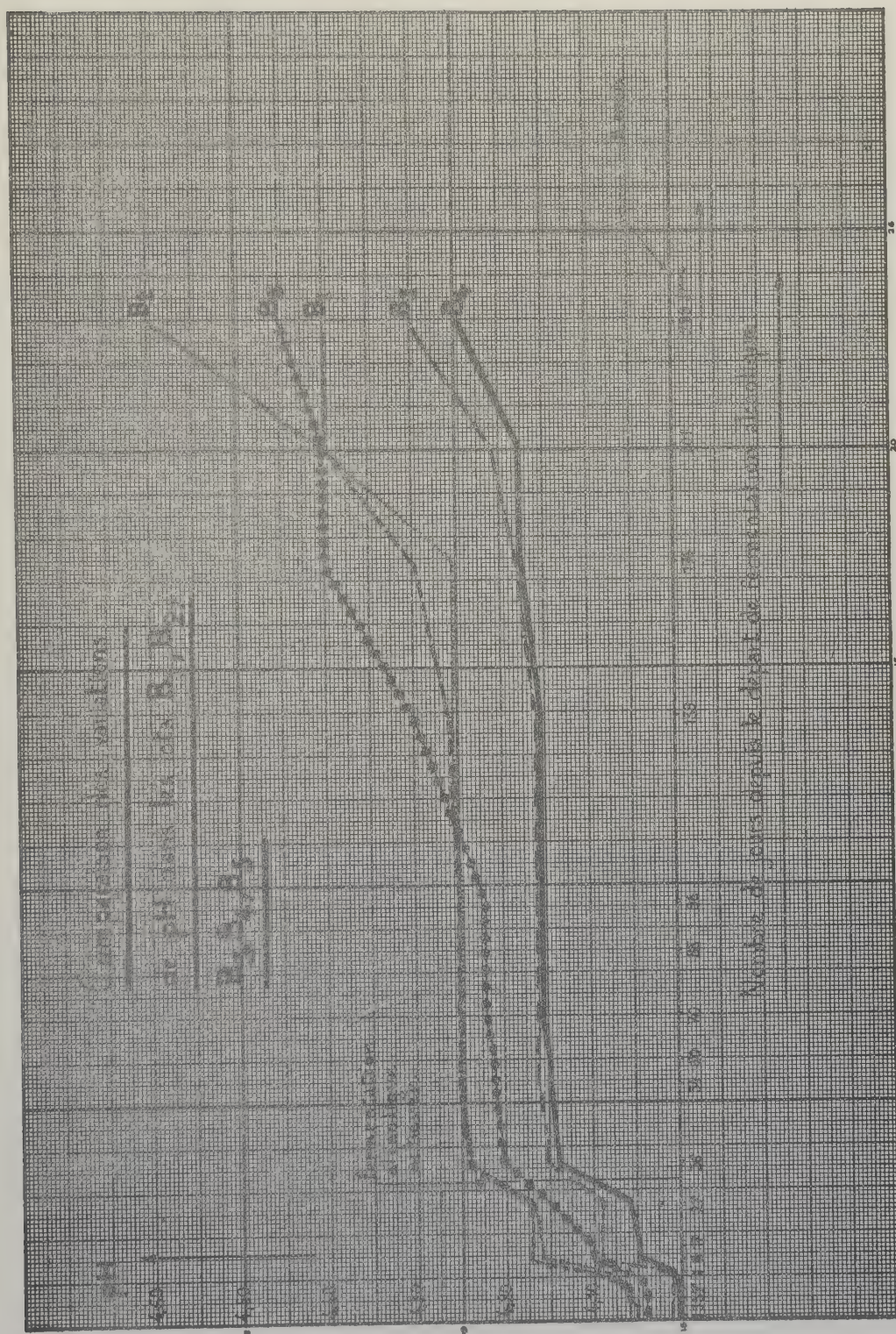


Fig 25

La courbe du pH de l'échantillon B_4 se détache nettement de l'ensemble, par les valeurs inférieures qui la caractérisent.

§ 4. Variation du potentiel d'oxydo- réduction pendant la fermentation alcoolique.

Pour suivre cette évolution, nous avons effectué des mesures pendant trois mois. Le tableau XXXIV résume les chiffres de nos observations.

VARIATIONS DU POTENTIEL D'OXYDO-REDUCTION PENDANT LA FERMENTATION ALCOOLIQUE.															
N.B. le 36 ème jour, deux mesures; avant ⁽¹⁾ et après ⁽²⁾ addition de SO ₂ . (Tableau XXXIV)															
Références	Epoque de la mesure, exprimée en nombre de jours écoulés après le début des essais.														
	1	3	5	7	11	14	17	27	36 ⁽¹⁾	36 ⁽²⁾	54	60	70	85	.
B ₁	330	100	00	-75	60	270	345	305	300	206	240	290	280	260	
B ₂	245	160	4	-65	56	250	315	285	285	218	240	275	277	256	
B ₃	255	135	-5	-55	20	205	285	276	270	205	235	265	270	245	
B ₄	241	140	-18	-70	16	183	285	276	249	165	220	250	249	225	
B ₅	231	103	-15	-80	-13	245	310	316	300	210	240	275	276	246	

La courbe générale de comparaison (Fig 26) tirée de nos mesures, est en accord avec la bibliographie et en particulier avec l'étude de MARECA-CORTES (206), à savoir que le potentiel le plus bas correspond à la plus grande intensité fermentaire, soit ici le 7ème jour de fermentation alcoolique.

A l'examen de la figure 26, il est facile de constater que la courbe de l'échantillon B₄ se situe bien au-dessous des autres, ce bas potentiel d'oxydo-réduction représente un gros avantage gustatif pour le Muscadet et le Gros-Plant, il doit en plus contribuer en large part à la tenue générale de ce vin. Dans ce même lot B₄ les conditions d'oxydo-réduction sont loin d'être favorables au déclenchement malolactique.

Comparison des variations de potentiel d'oxydo-réduction

dans les lots B_1, B_2, B_3, B_4, B_5 .

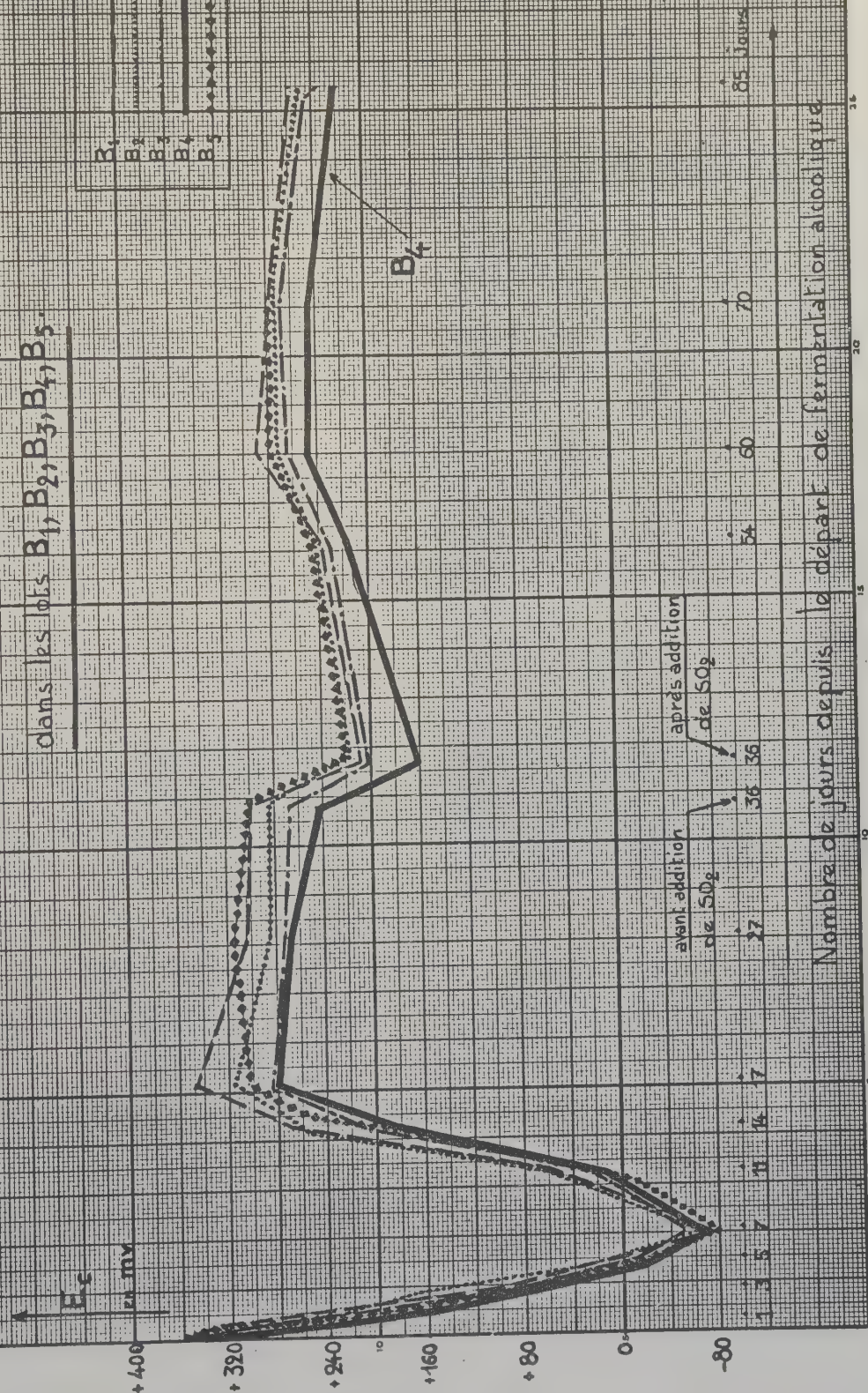
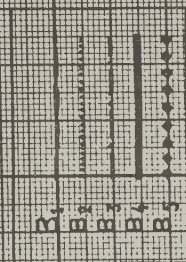


Fig 26

§ 5. Evolution malolactique, et phenomènes liés à cette dégradation.

Le troisième jour des essais, une chromatographie nous indique qu'aucun changement malolactique n'est intervenu (voir fig 27)

Par contre si l'on regarde les chiffres de l'acidité de titration établis au cinquième jour, on peut déjà constater une évolution des quatre lots sauf B₄. Voici ces valeurs:

B₁....3,30 g/l (exp. en H₂SO₄)

B₂....3,35 g/l d°

B₃....3,35 g/l d°

B₄....3,40 g/l d°

B₅....3,10 g/l d°

N.B. Ces acidités furent titrées après élimination du gaz carbonique par agitation sous vide à froid.

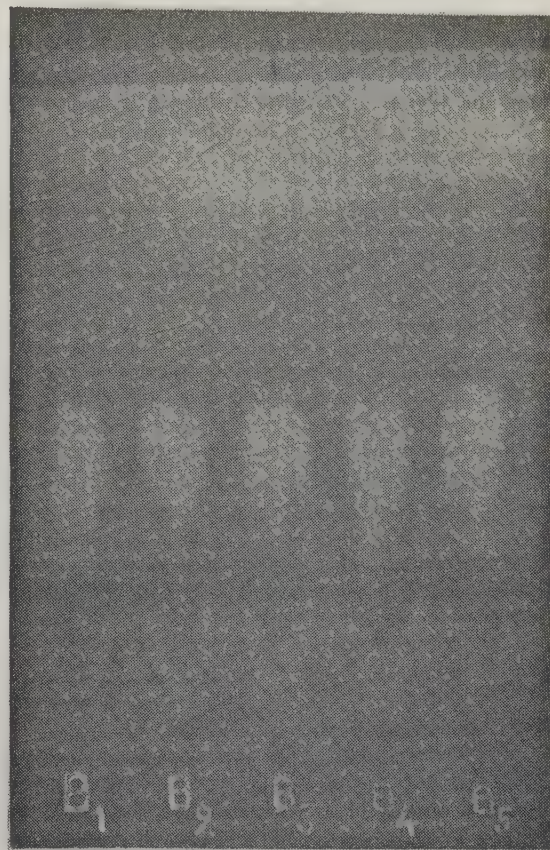


Fig 27

Vers la fin de fermentation alcoolique, l'évolution de l'acide malique n'est pas plus apparente. Le chromatogramme réalisé le trente-deuxième jour d'expérimentation (fig 28) ne nous apporte aucun changement visuel vis à vis du précédent.

L'aspect de chacun des cinq flacons est différent dès les premiers jours, cette différence est encore plus nette et plus facile à observer une fois la fermentation alcoolique terminée, soit le trente cinquième jour d'expérience.

Nous reproduisons ci-dessous nos résultats.

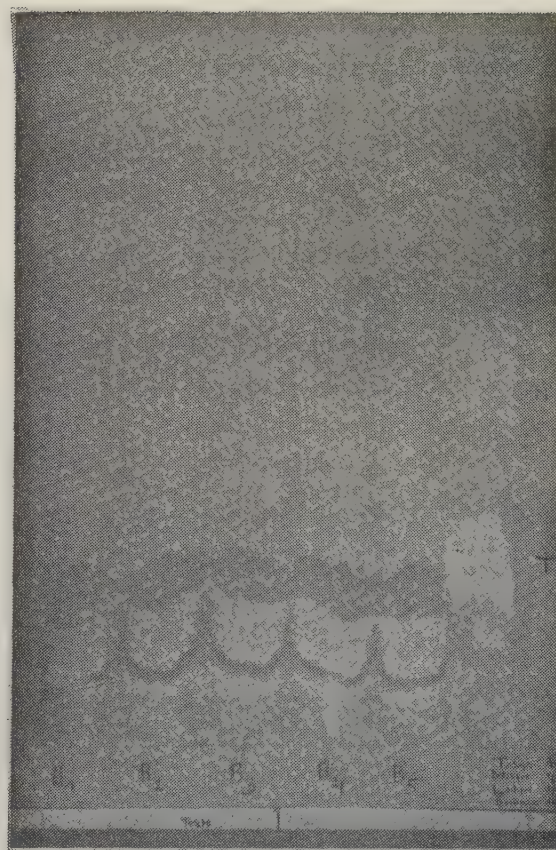


Fig 28

REFERENCE	LIMPIDITE	COULEUR et ASPECT. (Tableau XXXV)
B ₁	clair, sans brillant.	jaune.
B ₂	trouble	très jaune brun.
B ₃	trouble	jaune brun.
B ₄	très clair très limpide.	jaune très pâle (couleur normale de vin blanc sec.)
B ₅	trouble	jaune brun.

Le potentiel d'oxydo-réduction confirme bien la présentation de ces vins; l'échantillon B₄ au potentiel le plus bas, est le seul à avoir une couleur normale.

B₄.....E_C + 249 mv

B₁.....E_C + 300 mv

Une fois la fermentation alcoolique terminée, une légère addition d'anhydride sulfureux s'imposait, surtout du fait que dans ces essais 'B' la partie supérieure du vin n'était pas protégée de l'air ambiant et donc de l'oxydation, par une couche d'huile de vaseline neutre, comme dans les autres tests. Il faut ajouter aussi que les salles du laboratoire chauffées l'hiver, plaçaient ce vin dans de mauvaises conditions de conservation. Un apport de 90 mg/l de SO_2 est donc réalisé. Après cette addition le potentiel rédox s'abaisse de 70 à 90 mv, mais là encore le lot B_4 reste très différent des autres flacons, puisque sa valeur de potentiel passe à $E_C = +165$ mv, contre B_1 . $E_C = +206$ mv pour prendre le plus rapprochant.

Vingt jours après la fin de fermentation alcoolique, les vins se clarifient. Une numération au microscope effectuée à cette époque nous montre une décantation spontanée et naturelle pour le flacon B_4 . Voici les chiffres obtenus:

B_1	25.600	bact. par μl
B_2	32.000	d°
B_3	22.400	d°
B_4	9.600	d°
B_5	25.600	d°

Les chromatographies exécutées à intervalles rapprochés ne reflètent encore aucune évolution de l'acide

malique. La figure 29 obtenue par un chromatogramme du 13 Mars 1963 (2 mois après la fin de fermentation alcoolique) ne révèle pas de fermentation malolactique.

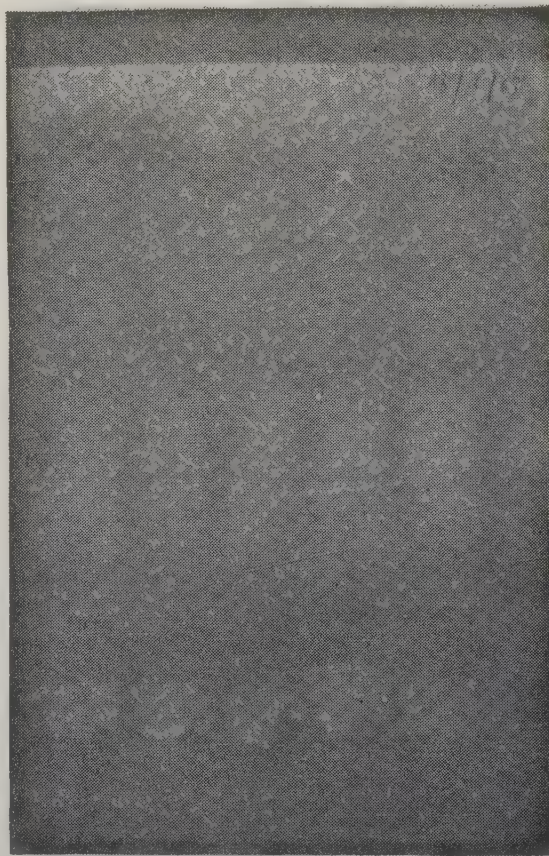


Fig 29

Connaissant la position malolactique des 5 échantillons, nous avons voulu savoir si notre technique de vinification en B₄, en dehors des caractères précis qu'elle a déjà donné à ce lot, n'apportait pas une modification dans la répartition des aminoacides.

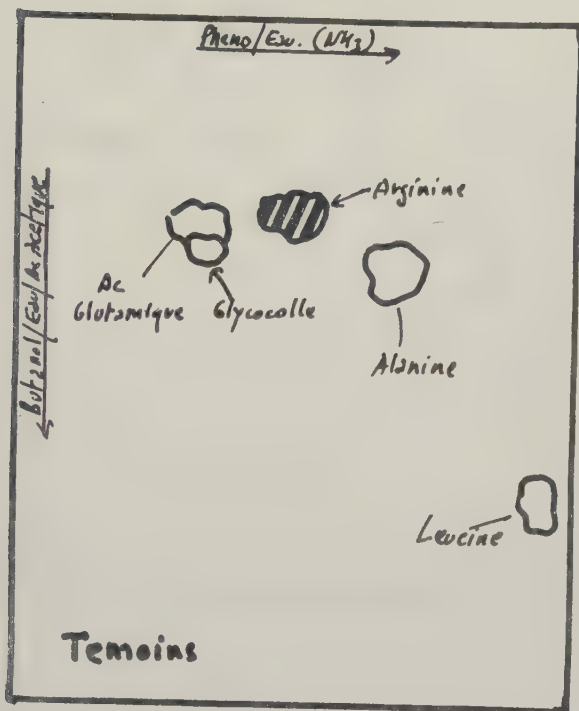


Fig 30

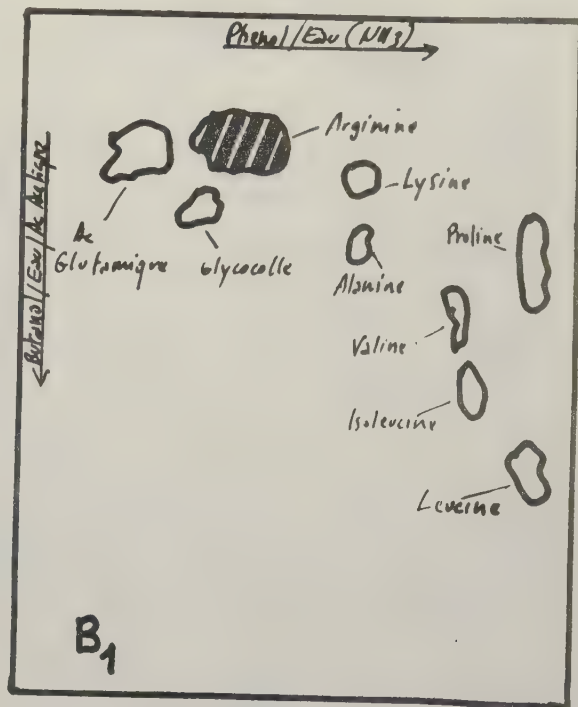


Fig 31

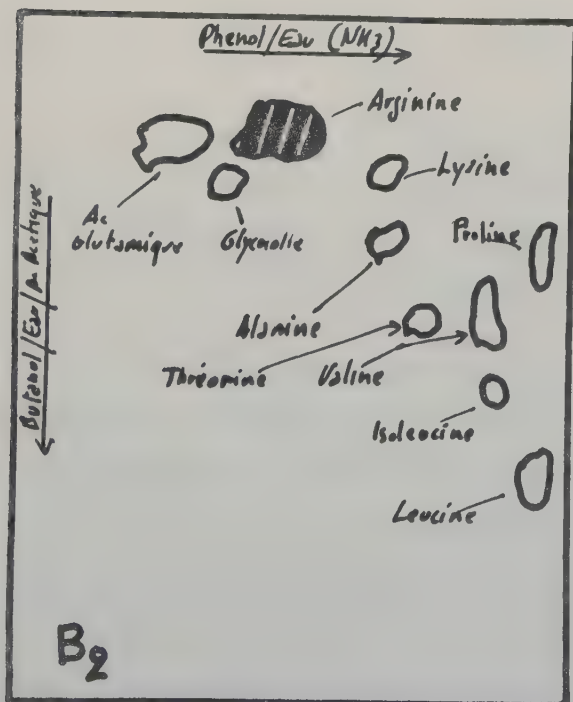


Fig 32

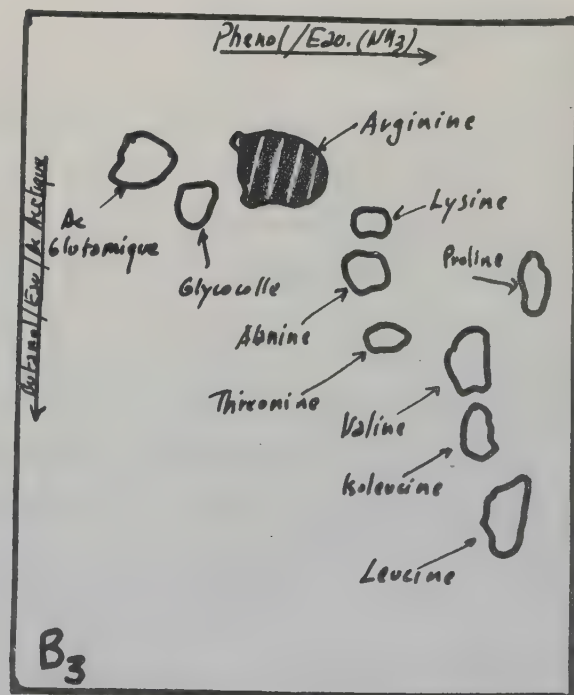


Fig 33

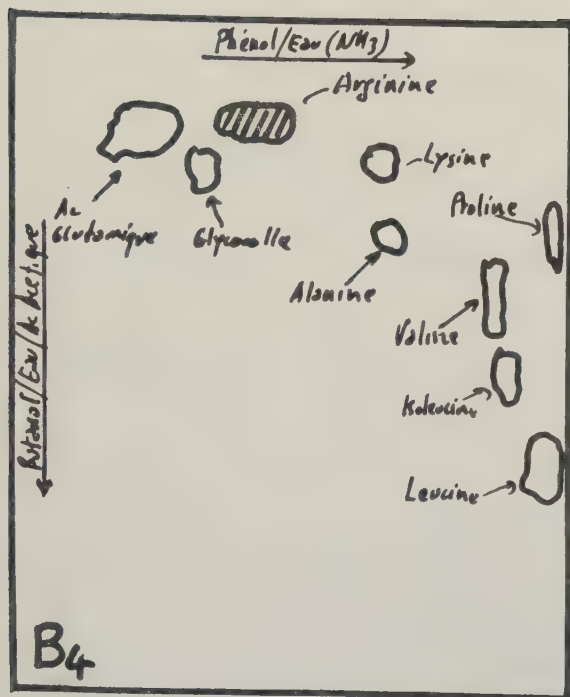


Fig 34

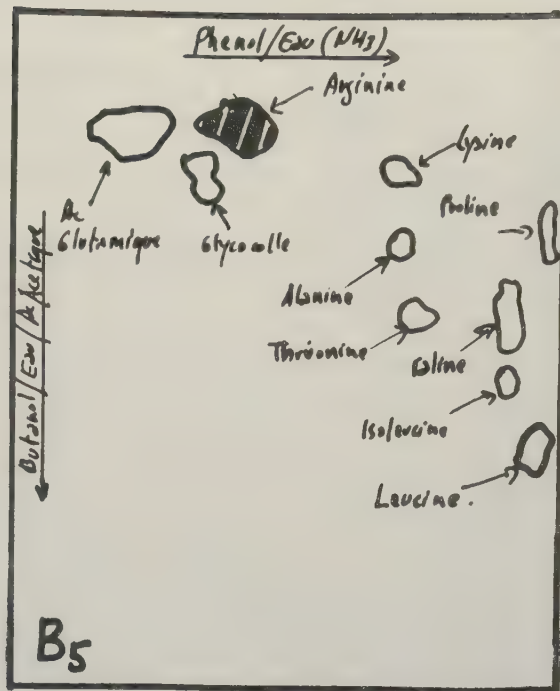


Fig 35

Deux mois après la fin de fermentation alcoolique, nous avons réalisé ces analyses. Le chromatogramme des acides organiques à cette date (I3/3/63) nous est donné par la figure 29. On peut diagnostiquer qu'aucune évolution malolactique n'apparaît dans les 5 échantillons.

Nous avons effectué ces déterminations dans les 5 lots comparativement à un témoin; les figures 30, 31, 32, 33, 34 et 35 représentent les chromatogrammes relatifs à ces déterminations. La photographie sur film et le tirage sur papier de ces documents analytiques ne permet aucune comparaison optique, ces figures sont placées ici dans un seul but d'illustration. Les chiffres obtenus sont consignés dans le tableau XXXVI.

TENEUR EN AMINOACIDES DES VINS B₁, B₂, B₃, B₄ et B₅ AVANT

FERMENTATION MALOLACTIQUE.

(Tableau XXXXVI)

Références.	Valeurs en milligrammes par litre.					Valeurs en intensité.					
	Leucine.	Alanine.	Arginine.	Glycocolle.	Acide glutamique exprimé en glutamate de calcium.	Proline	Isoleucine	Valine.	Lysine.	Thréonine	Position malolactique
B ₁	I75	20	I75	I60	225	xxx	xx	xx	x	mul	n.c
B ₂	I60	25	I85	I60	235	xxx	xx	xxx	xxx	x	n.c
B ₃	I75	40	I85	I90	230	xx	xxxx	xxxx	xx	xx	n.c
B ₄	I70	I5	I40	I70	240	xxx	xxx	xx	xxx	mul	n.c
B	I60	35	I85	I75	275	x	xx	xx	xxx	x	n.c

Dans ce tableau les aminoacides sont présentés en milligrammes par litre, sauf pour les 5 derniers où la valeur est donnée en intensité; le signe xxxx correspondant à la plus grande et le signe x à la plus faible.

L'examen de ces chiffres nous permet de tirer quelques idées premières. Dans les lots B₁, B₂, B₃, B₄ et B₅ examinés, la leucine, le glyco-colle et l'acide glutamique sont en concentrations quasi-égales, l'alanine est plus irrégulière avec la teneur la plus faible pour B₄. Quant à l'argi-nine son taux est pratiquement constant dans 4 lots, sauf pour B₄ qui

est nettement carencé en cet élément.

A cette étape de nos travaux, il nous est possible de dégager quelques observations générales:

En effet la vinification en B₄ présente des caractères particuliers:

- Fermentation alcoolique sous potentiel oxydo réducteur inférieur à la normale.
- Pendant et à la fin de fermentation alcoolique, pH plus bas qu'en vinification traditionnelle. Cet abaissement de pH persiste après la fermentation alcoolique.
- Meilleure limpidité dès la fin de fermentation alcoolique.
- Malgré le manque de protection des essais contre l'oxydation produite à la couche supérieure du moût; le vin B₄ présente une belle couleur jaune très pâle.
- Enfin, dans le domaine des aminoacides, il semblerait que cette conduite particulière de vinification, appauvrisse le milieu en alanine et arginine.

Nous avons gardé ces essais à la température du laboratoire, et au bout de 6 mois l'évolution de l'équilibre acide malique-acide lactique était la suivante:

- | | |
|----------------|--|
| B ₁ | fermentation malolactique commencée, non achevée |
| B ₂ | fermentation malolactique achevée. |
| B ₃ | fermentation malolactique achevée. |
| B ₄ | fermentation malolactique <u>non commencée.</u> |
| B ₅ | fermentation malolactique achevée. |

Les mesures électrométriques confirment l'évolution micro-biologique; nous les avons groupées dans le tableau XXXXVII.

EVOLUTION MICROBIOLOGIQUE DES ECHANTILLONS DE LA SERIE B.		
VALEURS DU pH.		
(tableau XXXVII)		
Reférences.	Position malolactique.	pH
B ₁	Fermentation malolactique commencée, non achevée	4,33
B ₂	 d°..... achevée	4,40
B ₃	 d°..... achevée.	4,38
<u>B₄</u>	 d°..... <u>non commencée</u>	4,23
B ₅	 d°..... achevée	4,35

Avant de tirer les conclusions définitives de cette série d'essais B , nous présentons dans les lignes suivantes des travaux orientés sur le même protocole et référencés sous la dénomination : essais T.

B) Essais " T."

Dans ce groupe T, T₁ l'expérience a été conduite comme précédemment. Voici les caractéristiques de ce moût de Muscadet.

Acidité totale.....5,9 g/l (en H₂SO₄)

Sucres.....192 g/l

Densité.....1071.

Préparation.

T.....moût brut.

T₁... ..moût brut + addition de 250 mg/l tanin noix de galle
+ addition de 100 mg/l phosphate di-ammonique + 37,5 mg/l
d'anhydride sulfureux.

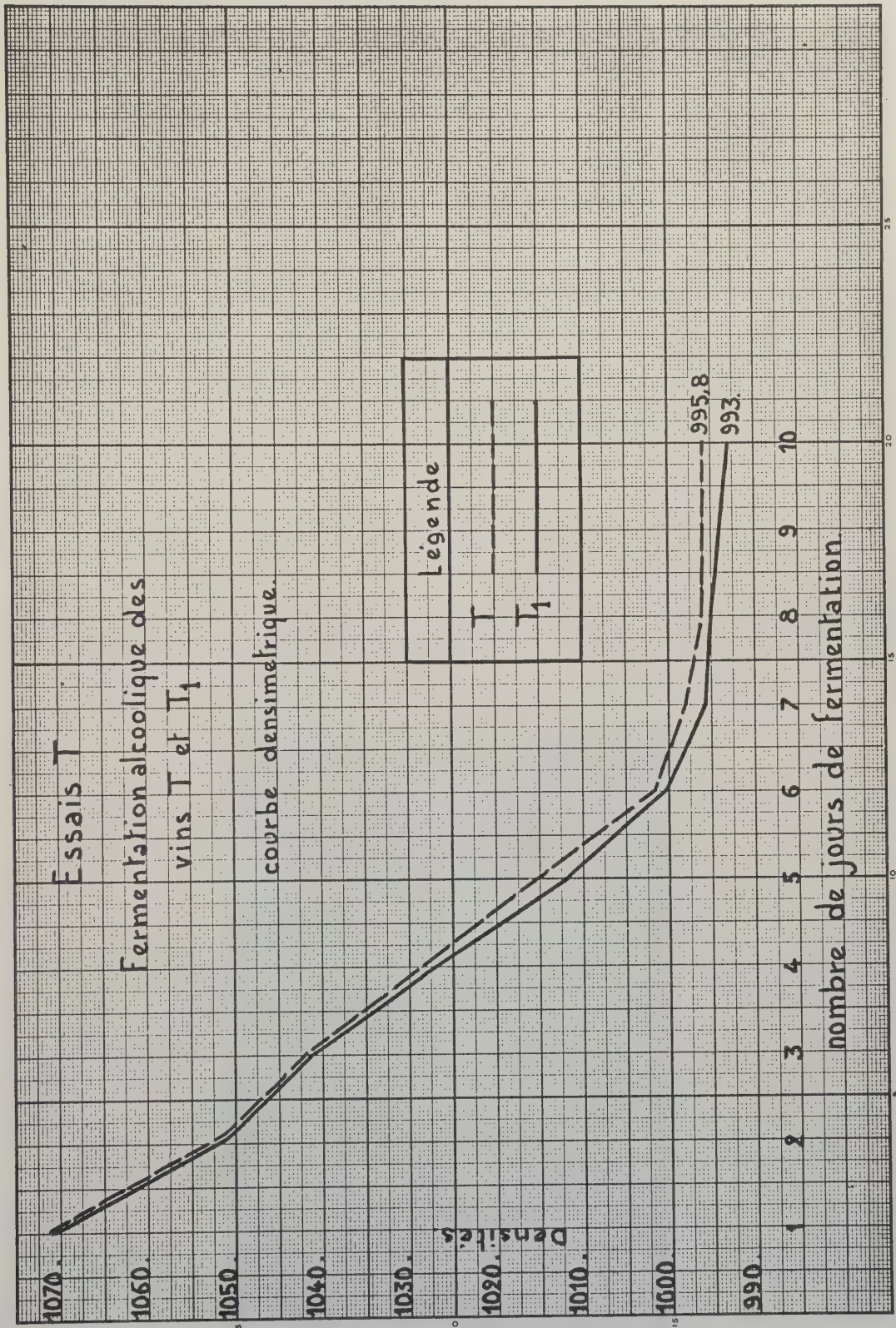


Fig 36.

Nous avons suivi par densimétrie la marche de la

fermentation alcoolique. La courbe présentée figure 36 et le tableau XXXXVIII nous permettent d'observer une dégradation plus poussée des sucres en T_1 , ce qui représente un avantage.

DENSITES COMPARATIVES DANS LES LOTS T et T_1 AU COURS DE LA FERMENTATION ALCOOLIQUE.										
(Tableau XXXXVIII)										
Références	1er jour	2ème jour	3ème jour	4ème jour	5ème jour	6ème jour	7ème jour	8ème jour	9ème jour	10ème jour
T	1071	1052	1042	1028	1015	1001	998	995,8	995,8	995,8
T_1	1071	1052	1041	1027	1012	1000	996,8	995	994	993

La figure 37 présente la répartition de l'acidité totale sur les principaux acides organiques. C'est une chromatographie obtenue avant le départ de fermentation alcoolique.



Fig 37.

Deux mois après la fin de fermentation alcoolique, l'équilibre acide malique-acide lactique n'est toujours pas détruit, la figure 38 en permet l'observation.

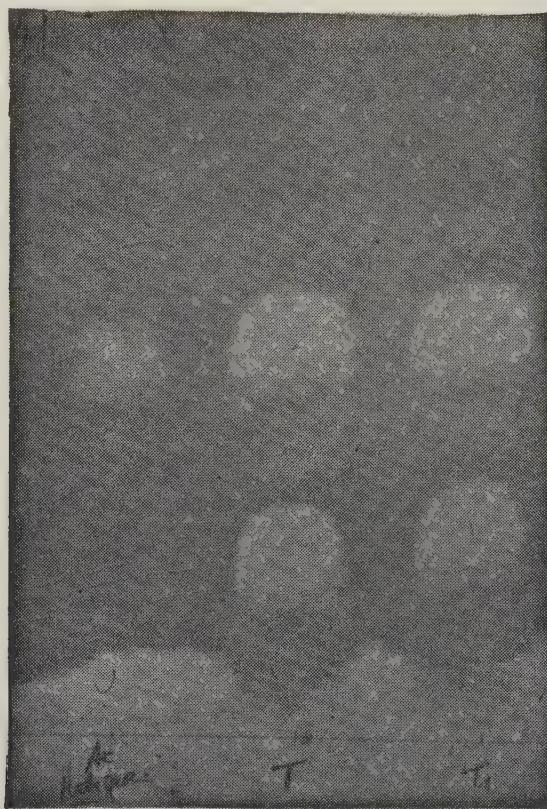


Fig 38.

C'est trois mois après la fin de fermentation alcoolique que nous avons effectué les déterminations d'azote; la carence en cet élément est très nette pour le vin élaboré selon notre technique soit l'échantillon T₁.

Référence	Azote total en mg/l	Azote minéral en mg/l	Azote organique. en mg/l
T	252,0	9,8	242,2
T ₁	212,8	8,4	203,6

Il était fort intéressant de savoir si cet appauvrissement azoté se traduisait également sur le stock aminoacide.

Des chromatographies sur papier, précédées de percola-

tions sur résines échangeuses de cations, comme nous l'expliquons au chapitre des méthodes analytiques; nous ont fourni les valeurs suivantes pour l'arginine et l'alanine.

Références	Arginine en mg/l.	Alanine en mg/l.
T	160	80
T ₁	80	30

Les figures 39 et 40 sont placées ici pour illustrer ces déterminations.

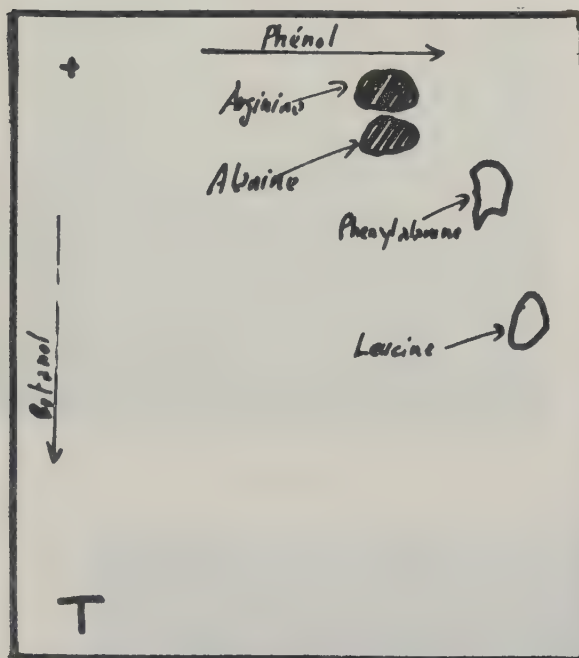


Fig 39

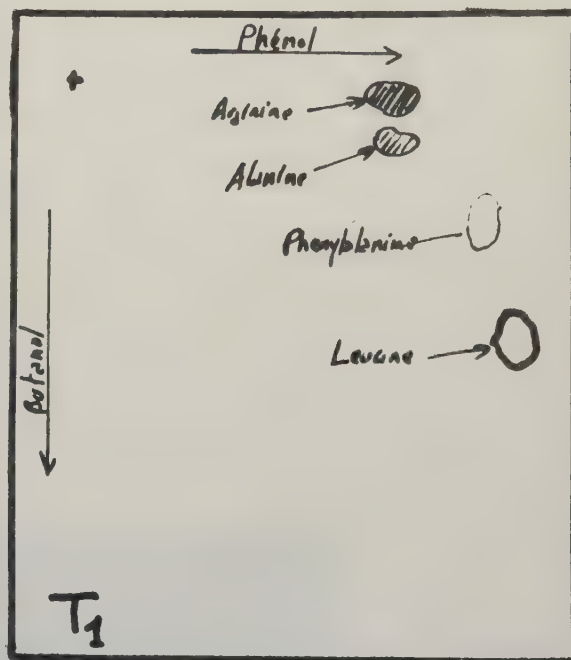
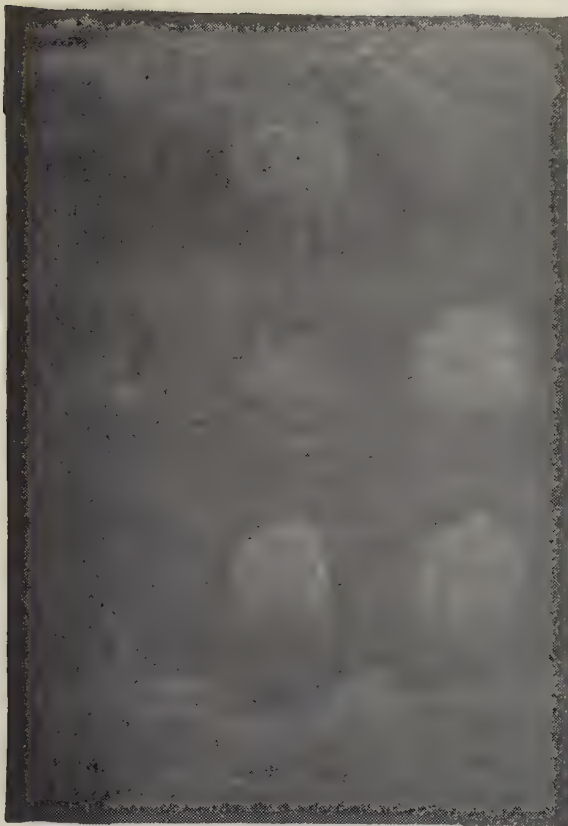


Fig 40.

Les chiffres exposés ci-dessus pour ces deux amino-acides, ont été vérifiés par des analyses sur doseur automatique type "Technicon" au Laboratoire de Physiologie Végétale de l'Université Catholique de Toulouse dirigé par le R.P.CARLES. Nous tenons à exprimer ici au R.P.CARLES nos vifs remerciements pour ces déterminations.

Avant de tirer les conclusions de ces travaux, nous tenons à faire remarquer qu'au bout de 4 mois, le vin du lot T est rétrogradé à 90% et que par contre, une fois de plus, on peut apprécier l'efficacité de notre technique en T₁, puisque cet échantillon possède encore tout son stock d'acide malique.



Cette propriété de l'échantillon T_1 est d'autant plus remarquable que les flacons sont restés depuis le premier jour à la température du laboratoire.

La différence d'évolution malolactique entre T et T_1 est très facilement perceptible sur la figure 41.

Fig 41.

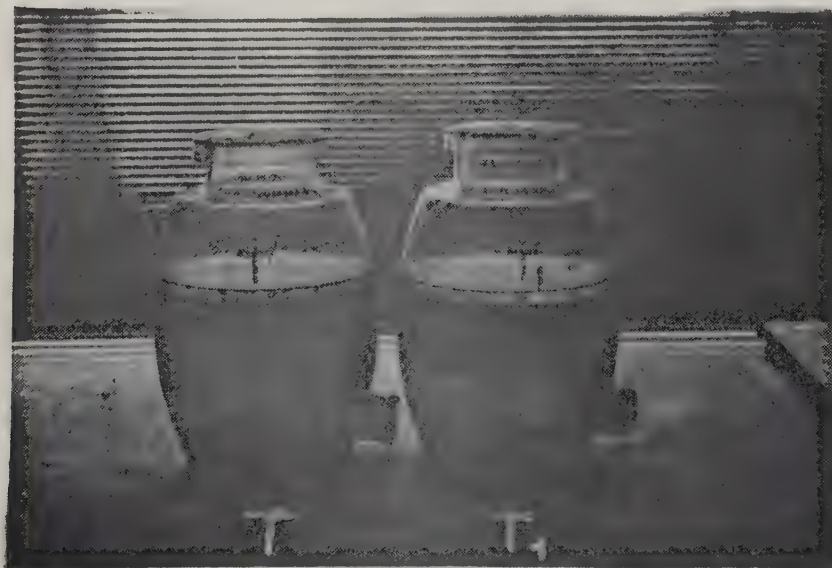


Fig 41 bis.

La fermentation malolactique en T provoque un trouble important (voir figure 41 bis) par la présence de bactéries lactiques; par contre le flacon T_1 reste limpide.

C) Conclusions des essais B & T.

En plus des caractéristiques physico-chimiques spéciales provoquées par notre mode de vinification et exprimées à la fin de la série des essais B, on peut extraire de ces travaux que tout se passe comme si cette technique personnelle appauvrissait le moût et par suite le vin, en aminoacides et plus particulièrement en alanine et surtout arginine.

Après l'exposé de ces travaux prouvant la carence aminoacide obtenue par des conditions spéciales de vinification, nous allons présenter les séries d'essais D, H, et P expliquant le rôle de l'arginine surtout et de l'alanine dans la décarboxylation de l'acide malique, et montrant de façon évidente la consommation de ces éléments azotés par les bactéries lactiques. En même temps nous trouverons d'autres preuves de l'efficacité de notre procédé.

D) Essais "D."

En 1963, nous avons voulu reprendre le même protocole expérimental sur des moûts différents tant par la région que par les caractères de la récolte. En effet nous savons que l'équilibre entre les composants est rarement le même d'une année à l'autre.

Le moût de Muscadet fut prélevé directement chez le viticulteur à la cuve du pressoir aussitôt la fin des derniers serrages de la vendange et après homogénéisation de l'ensemble. Le moût logé en bonbonnes de 30 l fut apporté rapidement au laboratoire; sa composition était la suivante:

pH.....	3,2
E _G	+278 mv
rH.....	19,6
Acidité totale.....	8,1 g/l (exp. en H ₂ SO ₄)
Sucres réducteurs.....	192,0 g/l
Matières tannoïdes totales.....	0,12 g/l

La préparation des 5 lots se déroulait de la façon qui suit:

D₁....Moût tel.

D₂....Moût tel + 250 mg/l de tanin de noix de galle.

D₃....Moût tel + 250 mg/l de tanin de noix de galle + 150 mg/l de phosphate di-ammonique + 37,5 mg/l d'anhydride sulfureux.

D₄....Moût tel + 37,5 mg/l d'anhydride sulfureux.

D₅....Moût tel + 37,5 mg/l d'anhydride sulfureux + 250 mg/l de tanin de noix de galle.

Après ces apports et avant fermentation alcoolique, les mesures électrométriques deviennent alors:

	pH	E _C	rH
D ₁	3,2	+278	19,6
D ₂	3,2	+240	18,4
D ₃	3,2	+170	17,0
D ₄	3,2	+185	19,0
D ₅	3,2	+175	18,0

La chromatographie des acides organiques, une fois la fermentation alcoolique achevée soit 23 jours après le début des essais, permet de constater (Fig 42) qu'aucun des échantillons ne présente de rétrogradation malolactique.

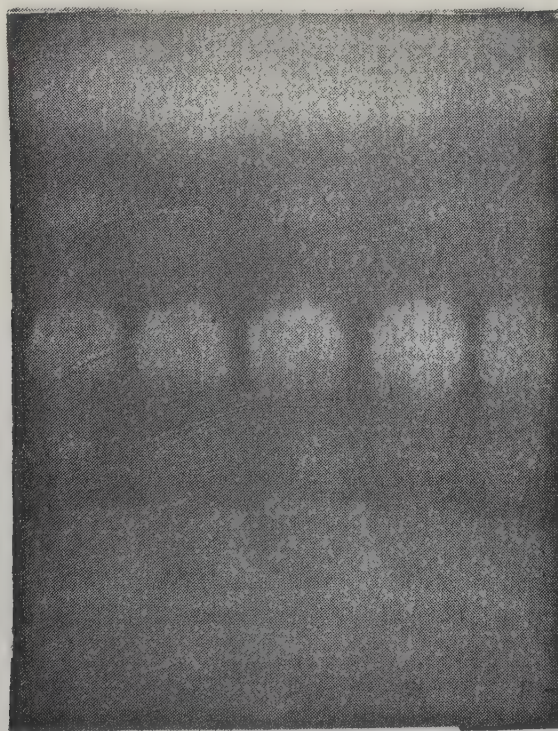


Fig 42.

Mais dès le 22 novembre 1963, au 45 ème jour, une évolution se remarque déjà dans D₁ et D₄ (Fig 43); et 4 mois après

le début de cette expérience, tous les vins sauf D₃, ont achevé leur rétrogradation malolactique. (voir chromatogramme Fig 44)

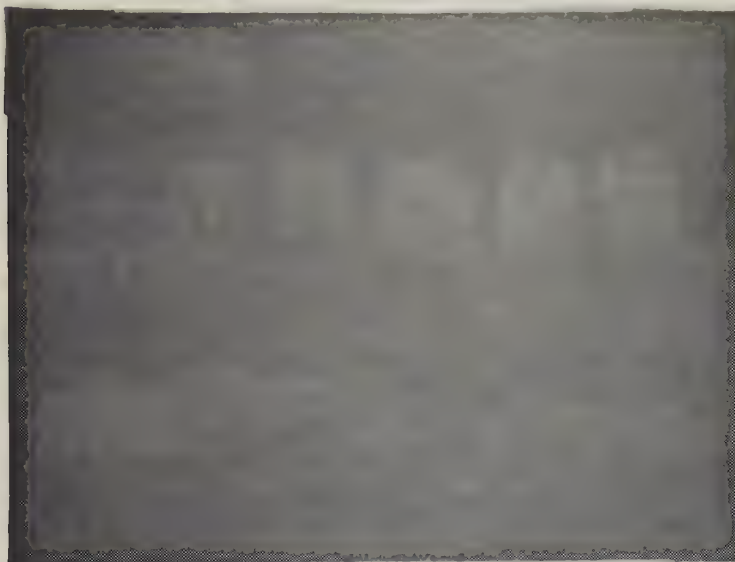


Fig 43.

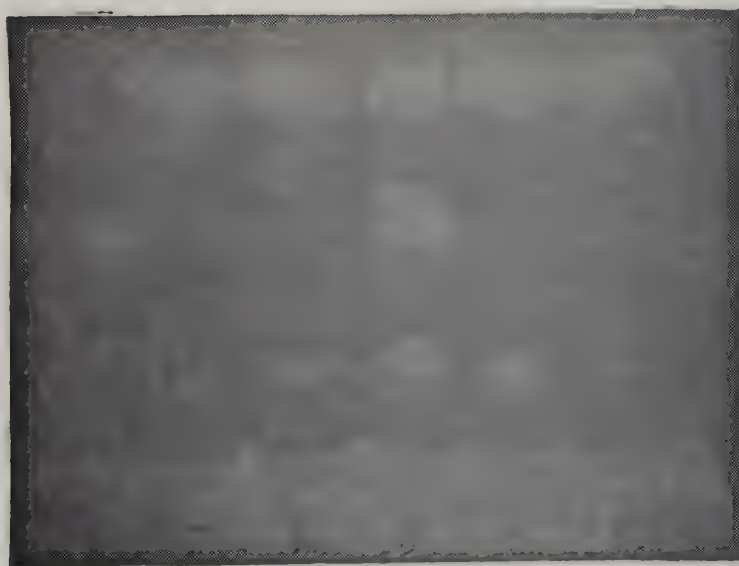


Fig 44.

Ces résultats sont d'autant plus remarquables que ces vins n'ont jamais reçu d'anhydride sulfureux et qu'ils étaient placés dans des salles chauffées l'hiver. Ces conditions de température sont cependant beaucoup plus favorables à la fermentation malolactique que celles existant dans les chais de conservation des vins.

Les photographies 45 et 46 mettent bien en évidence la

grande différence d'aspect entre le bocal D₃ et les autres flacons; ce premier présentant une limpidité parfaite .



Fig 45.



Fig 46.

Pour éviter d'autres altérations microbiennes qui gêneraient la suite de notre étude, nous avons fait une addition d'anhydride sulfureux à cette époque, dans tous les bocaux. Cependant en ce qui concerne le flacon D₃, nous avons soutiré 250 ml de celui-ci avant l'incorporation de l'anhydride sulfureux. Ces 250 ml référencés D₃(A), furent placés à l'étuve bactériologique à 30°C pour tenter d'obtenir la décarboxylation de l'acide malique.

Les variations de pH pendant cette expérience nous sont

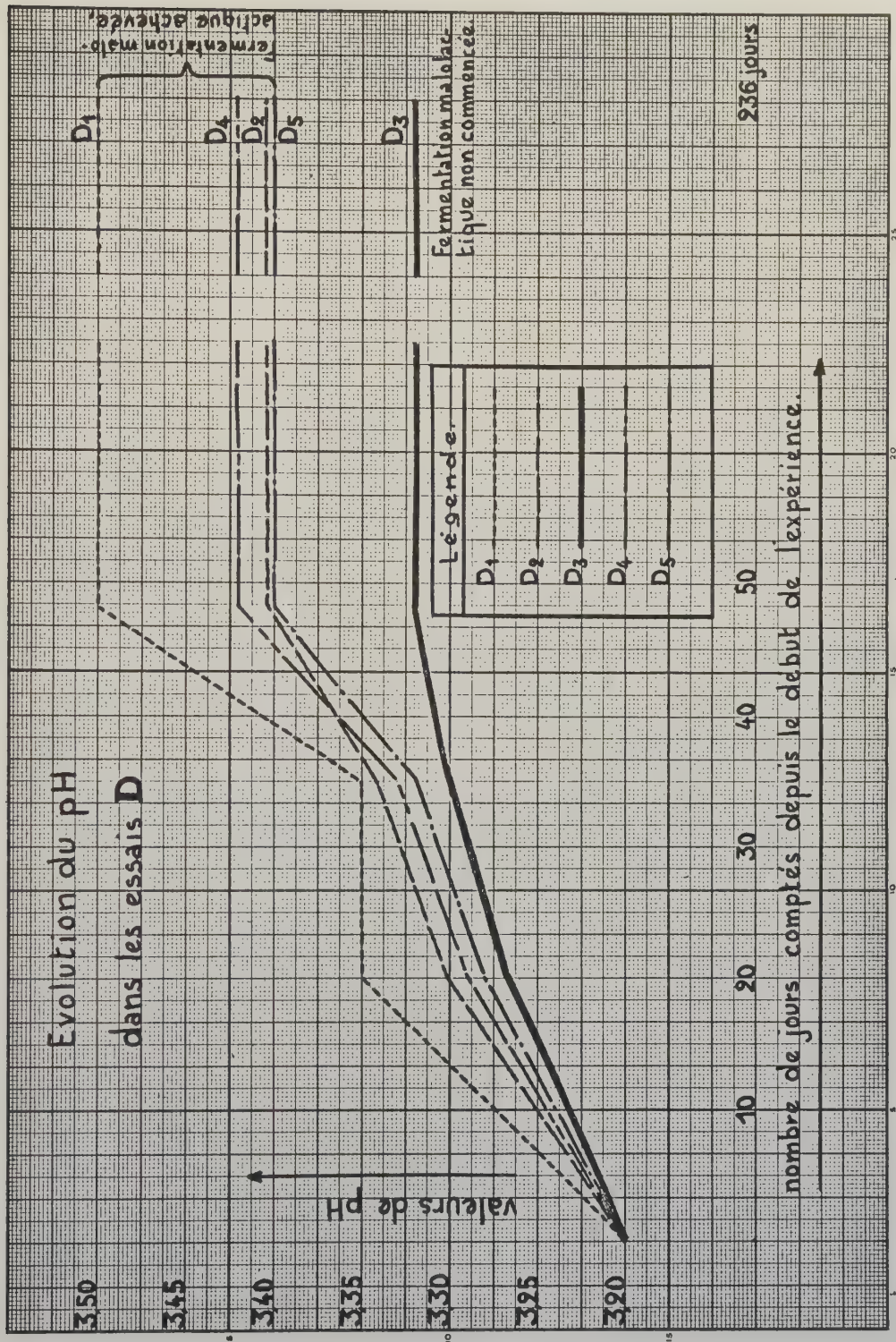


Fig 47.

données par la courbe de la figure 47 extraite du tableau XXXXIX.

Le pH du vin D₃ reste bien au dessous des autres lots. Enfin une

VALEURS DE pH DANS LES VINS DES ESSAIS D.					
(Tableau XXXIX)					
Références	pH initial	20 jours	35 jours	48 jours.....	236 jours
D ₁	3,20	3,35	3,35	3,50	3,50
D ₂	3,20	3,28	3,32	3,40	3,40
D ₃	3,20	3,27	3,30	3,32	3,32
D ₄	3,20	3,29	3,33	3,42	3,42
D ₅	3,20	3,30	3,34	3,40	altéré.

chromatographie au 190 ème jour d'essai permet d'apprécier la résistance particulière du vin D₃ à l'attaque des bactéries lactiques. Quelques chiffres du tableau L , nous permettrons de situer certains éléments analytiques dans tous les flacons D.

(Tableau L)					
	D ₁	D ₂	D ₃	D ₄	D ₅
Alcool % vol.....	11,18	11,00	11,18	11,16	11,10
Acidité volatile corrigée (g/l exp en H ₂ SO ₄).....	0,22	0,14	traces	0,04	0,16
Acidité totale (g/l exp H ₂ SO ₄)...	4,30	4,30	<u>5,40</u>	4,10	4,30
Somme Pectines + Gommès.mg/l.....	236,0	226,0	<u>440,0</u>	non dosé	non dosé
Azote minéral.... mg/l.....	39,76	35,28	<u>26,04</u>	32,48	35,20

L'augmentation d'azote minéral dans les 4 vins D₁, D₂, D₄, D₅ est en accord avec la bibliographie et plus particulièrement avec les études d'ARCHINARD et BOUDOT (53), de BARAGIOLA et GODET (56 travaux de LUTHI) qui ont permis de déceler la production d'ammoniac par les bactéries malolactiques. Par les chiffres de la somme Pectines + Gommès, on peut penser que les bactéries lactiques puisent une partie de leur énergie dans ces éléments.

Au point de vue biologique, les numérations sont bien en accord avec les chiffres qui précèdent et avec l'aspect des flacons présentés Fig 45 et 46.

D ₁	7.320 bact par	1
D ₂	5.400	1
D ₃	<u>400</u>	1
D ₄	7.400	1
D ₅	6.480	1

La figure 48 représente la microphotographie du vin du flacon D₃, la figure 49 celle réalisée en D₅, la différence est



Fig 48.

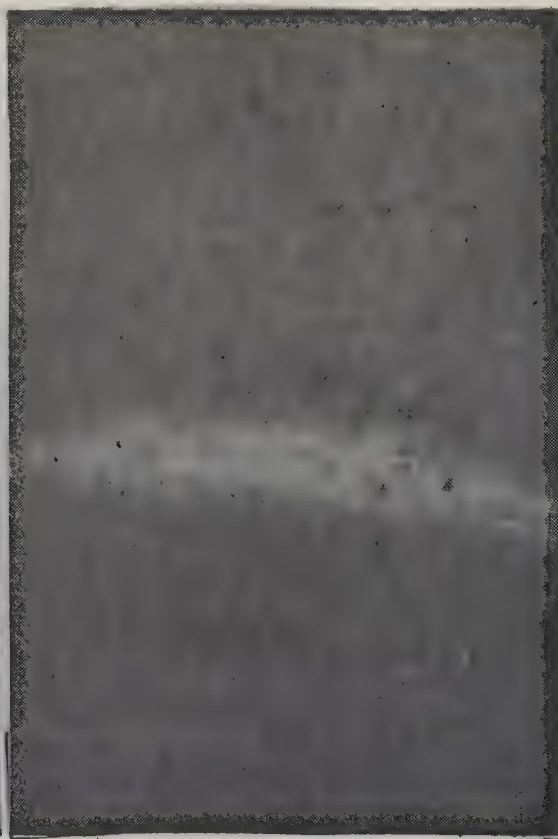


Fig 49.

très grande puisque sur la seconde photo il n'est pas possible d'apercevoir le compte-levure réticulé tellement ce vin est opalescent .

La rapidité de dégradation de l'acide malique dans les quatre lots D₁, D₂, D₄, D₅ ne nous a pas permis de connaître le stock aminoacide de ces vins avant fermentation malolactique, mais cependant la chromatographie de ces éléments azotés nous a apporté quelque lumière à ce phénomène.

A cette époque de nos travaux (190 jours depuis le début des essais) les positions malolactiques de ces vins étaient les suivantes:

- D₁.....fermentation malolactique achevée
- D₂.....fermentation malolactique achevée
- D₃.....fermentation malolactique non commencée
- D₄.....fermentation malolactique achevée
- D₅.....fermentation malolactique achevée.

Dans le flacon D₃(A) placé à l'étuve bactériologique depuis 2 mois à 30°C, nous pouvions observer une décarboxylation de l'acide malique. Nous avons comparé ce dernier vin, dans lequel la fermentation malolactique était provoquée, aux 5 autres. Le tableau LI nous propose l'interprétation de la valeur des aminoacides, les figures 50,51,52,53,54,55 les illustrent.

COMPARAISON DE LA TENEUR EN AMINOACIDES DES VINS D ₁ , D ₂ , D ₃ , D ₃ (A), D ₄ , D ₅ . (Tableau LI)							
Référence	Leucine	Alanine	Arginine	Glyco- colle.	Ac. Glut. exp en Glut. Ca	Proline	Valine
D ₁	900	700	traces	650	I.500	xxx	xxxx
D ₂	-	800	traces	400	I.500	x	xxxx
D ₃	500	1200	650	600	I.500	xxx	xxxx
D ₃ (A)	500	1000	traces	500	I.400	xxx	xxx
D ₄	450	900	mul	500	I.400	xxx	xxxx
D ₅	-	800	traces	350	I.000	xx	xxx
N.B. L'acide glutamique est exprimé en glutamate de calcium. Les valeurs sont en milligrammes par litre, sauf pour la proline et la valine où elles sont exprimées en intensité.							

La consommation d'Arginine est très grande par les bactéries malolactiques, puisque les 650 mg qui étaient présents

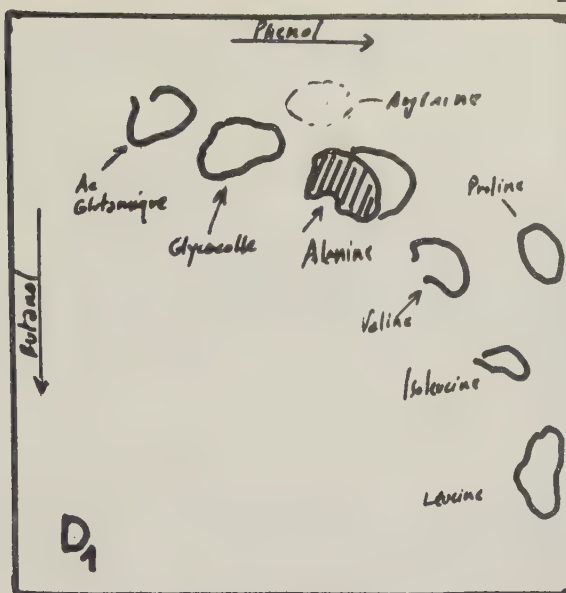


Fig 50

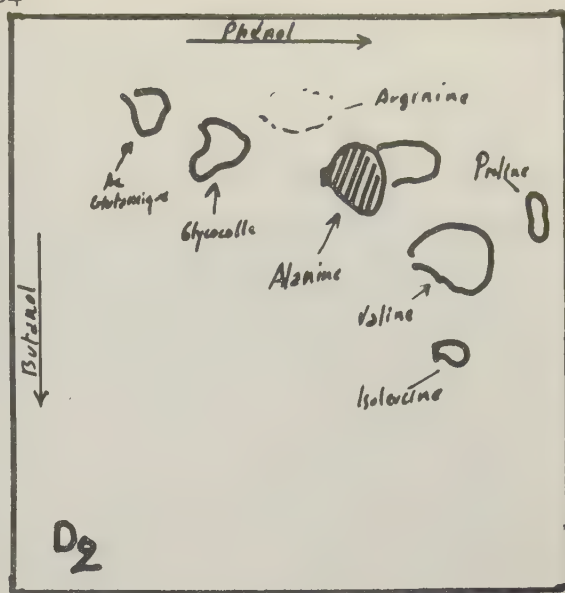


Fig 51

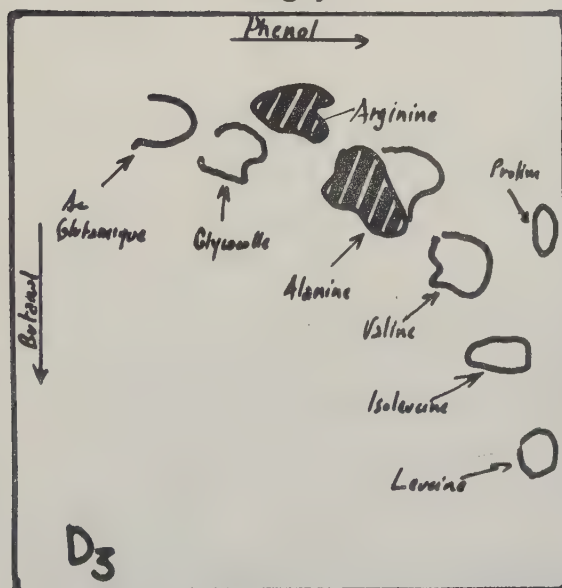


Fig 52

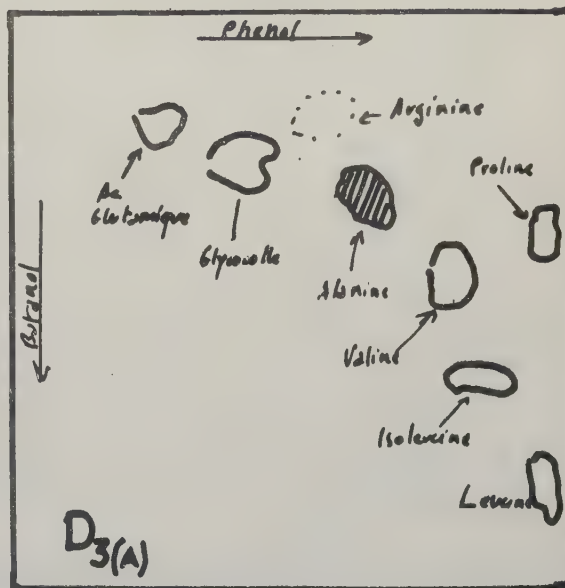


Fig 53

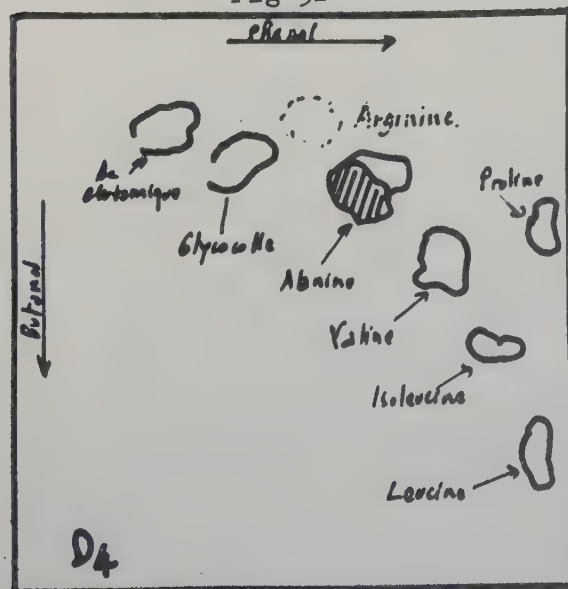


Fig 54

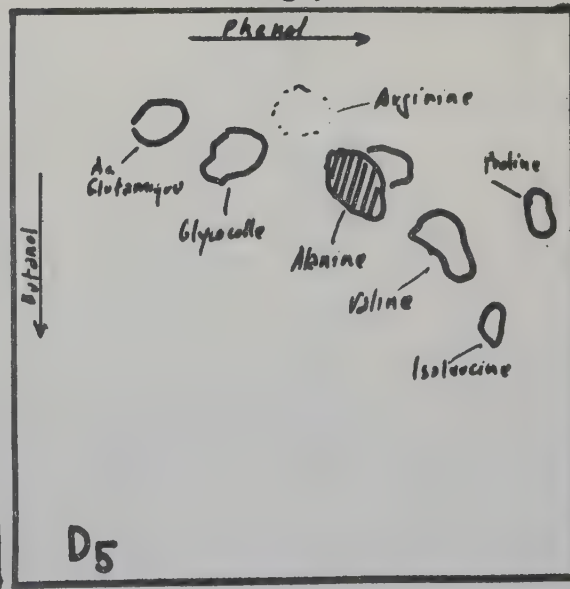


Fig 55

dans le vin D_3 , sont disparus en $D_3(A)$.

La conclusion à tirer de ces recherches, en dehors de la mise en évidence une fois de plus des résultats de notre technique de vinification, est le rôle important que semble jouer l'arginine dans la décarboxylation de l'acide malique. C'est pourquoi dans une autre série expérimentale nous avons voulu expertiser cette propriété. Ce qui a été réalisé dans les essais 'H'.

E) Essais "H."

Le mût de Muscadet utilisé à cette occasion est volontairement différent par le lieu de sa récolte; cette condition est indispensable pour pouvoir transposer nos conclusions à tout un vignoble. L'acidité totale était de 7,6 g/l (exp en H_2SO_4), le pH de 3,28, la préparation de l'expérimentation est expliquée ci-dessous:

H Mût brut.

H_1 Mût brut + 150 mg/l phosphate di-ammonique + 250 mg/l tanin noix de galle + 37,5 mg/l d'anhydride sulfureux.

H_2 même préparation que H_1 avec une addition de 150 mg/l d'arginine.

H_3 Mût brut + 150 mg/l d'arginine.

Après ces apports, les mesures sont les suivantes:

Référence.	pH	E_C en mv.
H	3,28	+ 230
H_1	3,28	+ 160
H_2	3,28	+ 165
H_3	3,28	+ 225

Le potentiel inférieur observé dans les lots H_1 et H_2 est en accord avec nos recherches précédentes, il est inhérent à notre procédé.

Le 9^{ème} jour de notre expérimentation, les bactéries malolactiques n'ont pas encore attaqué l'acide malique dans les 4 flacons. (voir la figure 56).

Un mois après la fin de fermentation alcoolique, la clarification naturelle et spontanée s'effectue en H_1 et H_2 . Les lots H et H_3 présentent un trouble grandissant accompagné d'un dégagement de gaz carbonique, et ceci plus particulièrement dans le bocal H_3 .

On peut facilement reconnaître cette intensité du trouble du vin H_3 sur la photographie présentée figure 57.

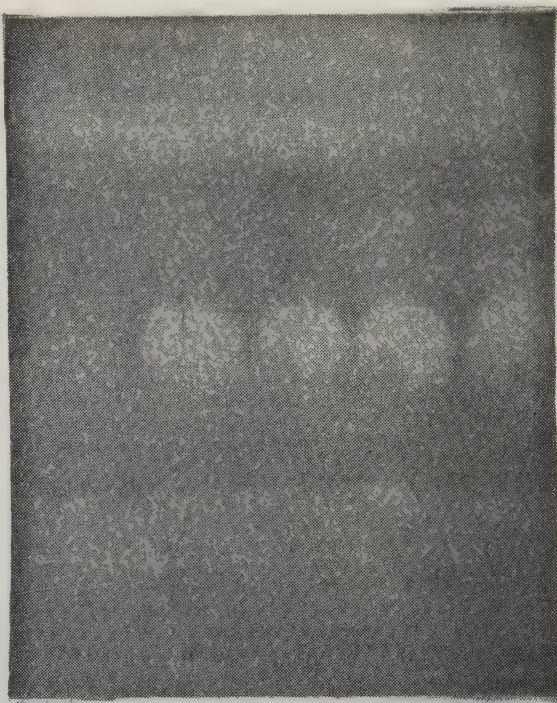


Fig 56.

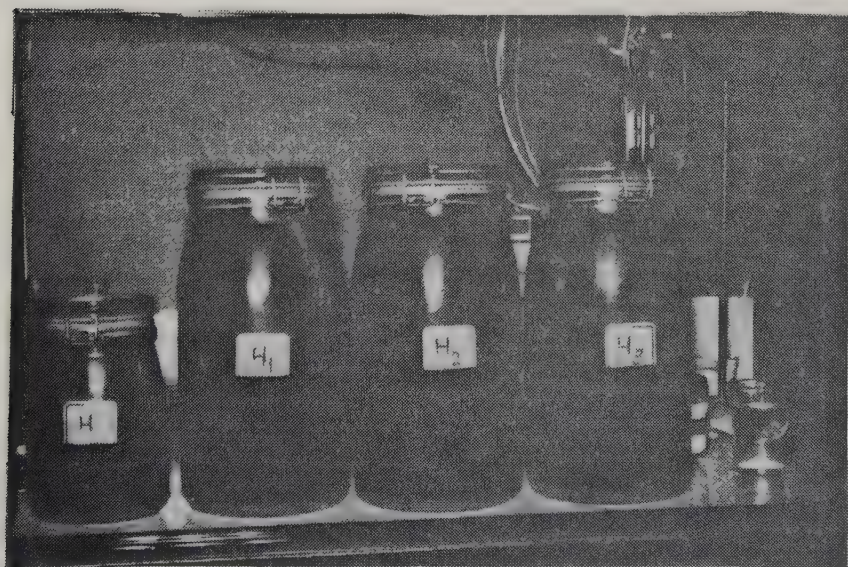


Fig 57.

Trente jours après la fin de fermentation alcoolique, on procède à la chromatographie des acides organiques, à la mesure du pH et de l'acidité de titration. Le vin du flacon H₃, traité à l'arginine est nettement plus avancé que H₁. La figure 58 nous présente ce chromatogramme.

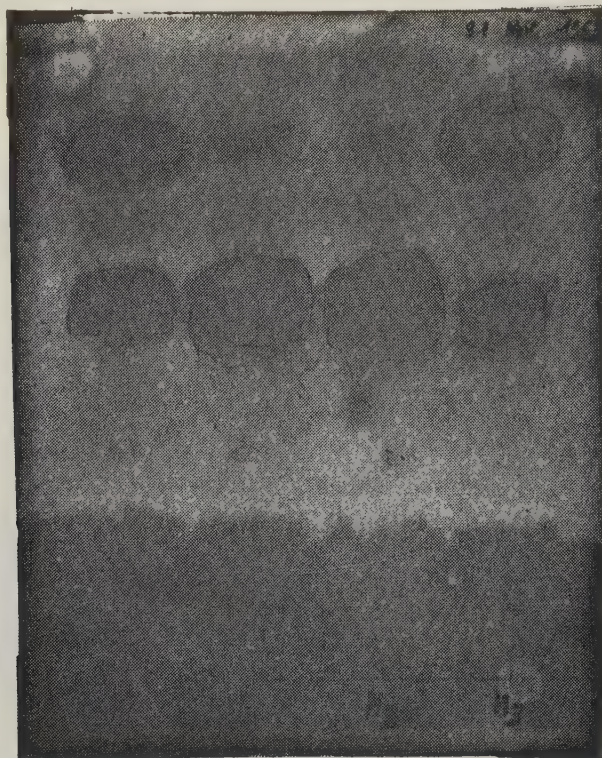


Fig 58.

Les chiffres que nous exprimons ci-après sont en correspondance parfaite avec la chromatographie.

Référence	Acidité de titration	pH
H	5,6 g/l (en H ₂ SO ₄)	3,60
H ₁	7,2 d°.....	3,40
H ₂	7,2 d°.....	3,40
H ₃	5,5 d°.....	<u>3,68</u>

Nous avons continué l'observation de ces échantillons, et nous avons pu remarquer que la rétrogradation de l'acide malique en acide lactique s'est effectuée assez rapidement en H, plus vite en H₃, et H₁ ainsi que H₂ ont gardé leur acidité initiale et la même répartition de cette dernière sur les différents acides organique.

Ces résultats visibles sur la figure 59 nous autorisent

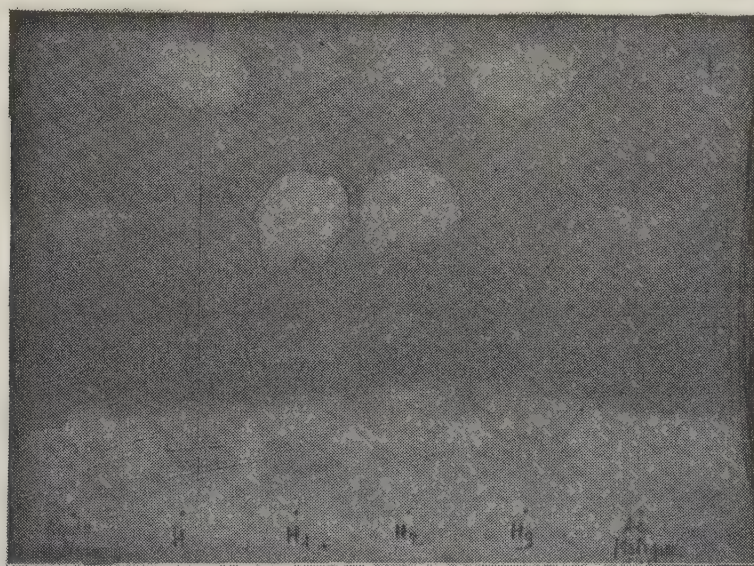


Fig 59.

à extraire trois points principaux de cette étude.

1°) L'arginine semble être un facteur activateur de la décarboxylation de l'acide malique.

2°) L'avantage de notre procédé de vinification est démontré, en H₁.

3°) Cette technique personnelle de vinification appliquée sur un moût enrichi en ARGININE, détruit l'effet stimulant de cet amino-acide. Ce qui confirmerait donc que notre méthode de vinification carence le moût en cet élément.

N.B. Nous signalons que nous n'avons pas observé de vitesse plus grande de fermentation alcoolique dans le moût H₃ traité à l'arginine. Cet aminoacide ne semble donc pas être un facteur important pour l'alimentation de la levure, les essais P et G le confirment.

F) Essais "P."

Le moût utilisé à cette étude résulte du mélange de plusieurs prélèvements de Muscadet effectués chez plusieurs viticulteurs. La préparation des flacons fut réalisée ainsi:

P Moût brut

P₁.....Moût brut + 150 mg/l phosphate di-ammonique,
+ 250 mg/l tanin de noix de galle + 37,5 mg/l
anhydride sulfureux.

P₂.....Moût brut + 150 mg/l arginine.

La fermentation alcoolique fut achevée en 15 jours environ.

Les caractéristiques au départ nous montrèrent une acidité assez élevée de 7,25 g/l (exp.en H₂SO₄) et un pH de 3,00. Cette dernière valeur entrava le développement des bactéries malo-lactiques, si bien qu'après un séjour de plusieurs mois sur lie aucune intervention de celles-ci n'était observée.(voir Fig 60)

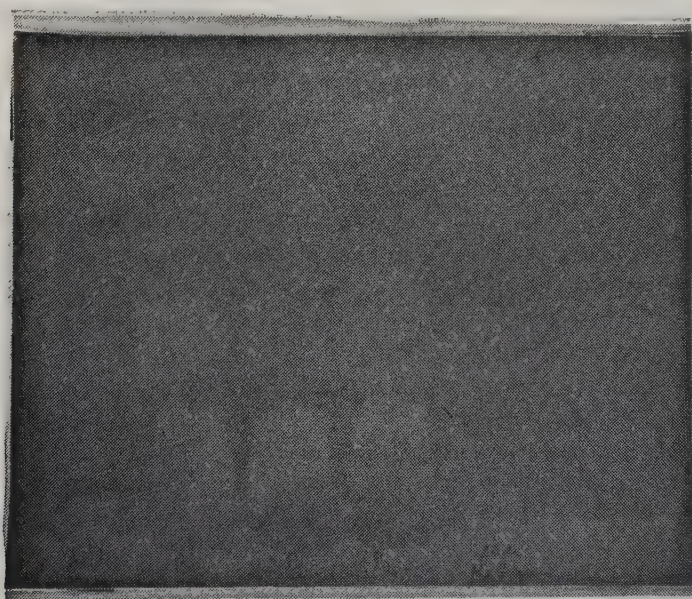


Fig 60.

Nous avons pensé qu'il était utile de connaître après

fermentation alcoolique et avant fermentation malolactique, le taux de quelques aminoacides; les figures 61, 62, 63, 64 et le tableau LII nous présentent ces résultats.

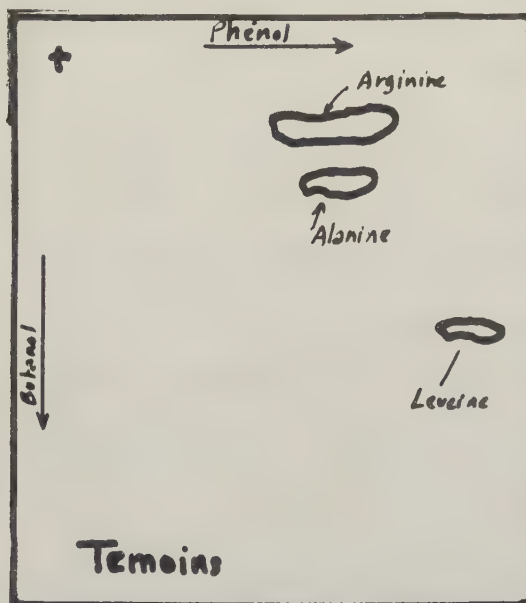


Fig 61

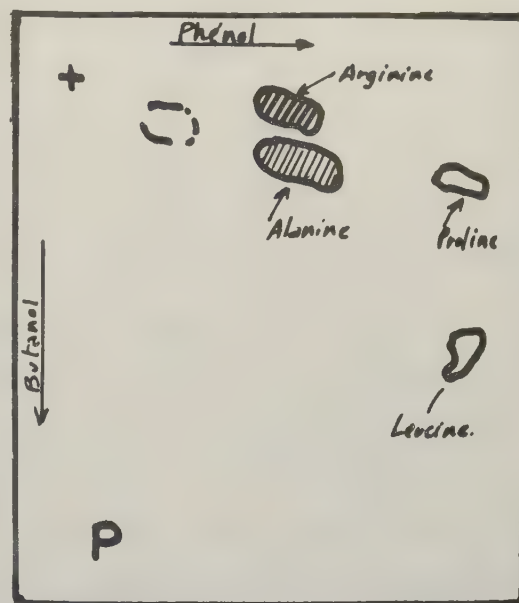


Fig 62

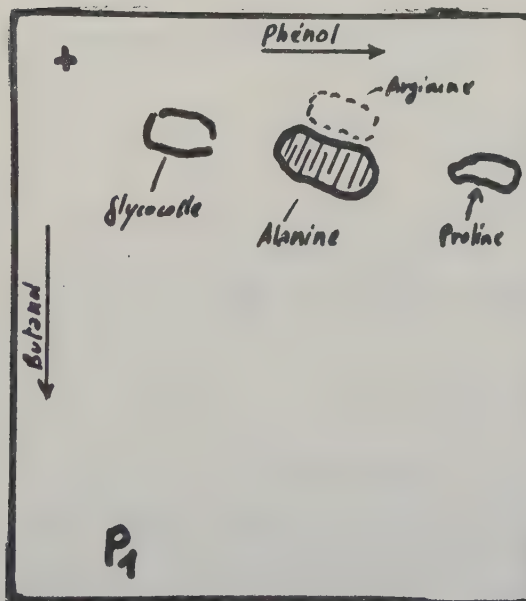


Fig 63

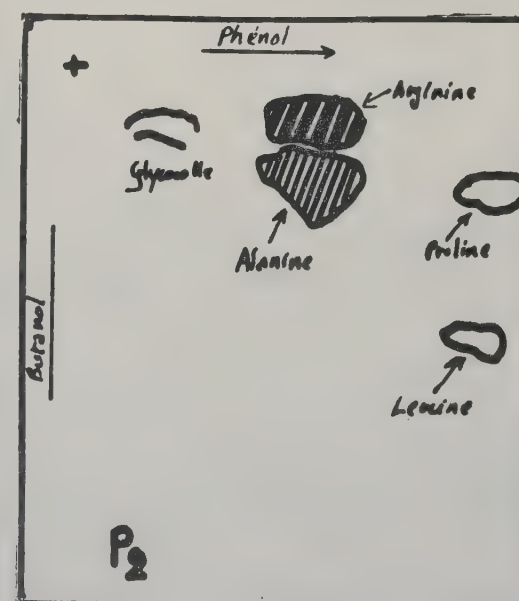


Fig 64

TAUX D'ARGININE ET D'ALANINE DANS LES VINS P, P ₁ , P ₂ valeurs en mg/l (Tableau LII)		
Référence	Arginine	Alanine.
P	200	62
P ₁	40	60
P ₂	370	100

Dans les concentrations d'arginine de P et P₂, on retrouve bien pour ce dernier l'apport exogène fait au départ. Le vin du flacon P₁ est très carencé en cet élément, conséquence de sa préparation suivant notre technique de vinification.

Les chiffres obtenus ci-dessus, nous montrent qu'un excès d'arginine n'est pas systématiquement consommé par la levure, cette dernière n'en serait donc pas si grande consommatrice que l'on a tendance à l'affirmer.

Une autre expérience nous a montré que l'arginine n'est pas à classer comme un grand activateur du développement des levures; ce sont les essais G

G) Essais "G".

La préparation des échantillons utilisés à ces travaux est calquée sur les tests précédents. L'observation a porté surtout sur la marche de la fermentation alcoolique.

G Moût brut.

G₁.....Moût brut + 150 mg/l phosphate di-ammonique
+250 mg/l tanin noix de galle + 37,5 mg/l d'
anhydride sulfureux.

G₂.....Moût brut + 150 mg/l d'arginine.

Le départ de fermentation alcoolique se fît tout d'abord dans le vin du flacon G₁, ensuite l'activité levurienne fut observée en G et plus tard en G₂.

La cadence de fermentation la plus rationnelle était remarquée en G₁.

Quelques jours après la fin de fermentation, le vin du lot G₁ était limpide; à ce stade G était encore trouble et G₂ présentait une opalescence très intense marquée de reflets 'bleus', pour utiliser l'appellation employée par SCHANDERL (47). Cet effet Tyndall provenait d'une active prolifération de bactéries malolactiques.

Les études de pressurages (essais L et F) que nous présenterons plus loin, complèteront ce test très court.

L'apport d'arginine dans le vin du flacon G₂ ne semble pas avoir activé la fermentation alcoolique, par contre l'effet stimulant vis à vis des bactéries malolactiques et déjà observé au cours d'autres expériences, a été confirmé.

Pour clore ces travaux plaçant bien en relief les avantages de notre technique de vinification sur vins blancs; nous mentionnons ici, une expérimentation sur vins rouges.

H) Essais E_3S & E_3PS .

Cette étude brève, nous montre la différence de fermentation alcoolique observée avec notre méthode, elle n'est orientée que sur ce phénomène de transformation des sucres en alcool.

Le moût expérimental de raisin est obtenu sur pressoir de laboratoire, comme le présente la figure 65.

Les caractéristiques analytiques au départ étaient les suivantes:

$$E_C = 50 \text{ mv}$$

pH = 3,6 (porté volontairement à cette valeur)

$$rH = 17$$

Sucres red. = 209 g/l.



Fig 65.

Préparation.

E_3S moût brut (raisins rouges)

E_3PS moût brut (raisins rouges) + 37,5 mg/l d' anhydride sulfureux + 150 mg/l phosphate di-ammonique + 250 mg/l tanin noir de galle.

La courbe densimétrique de fermentation alcoolique qui est

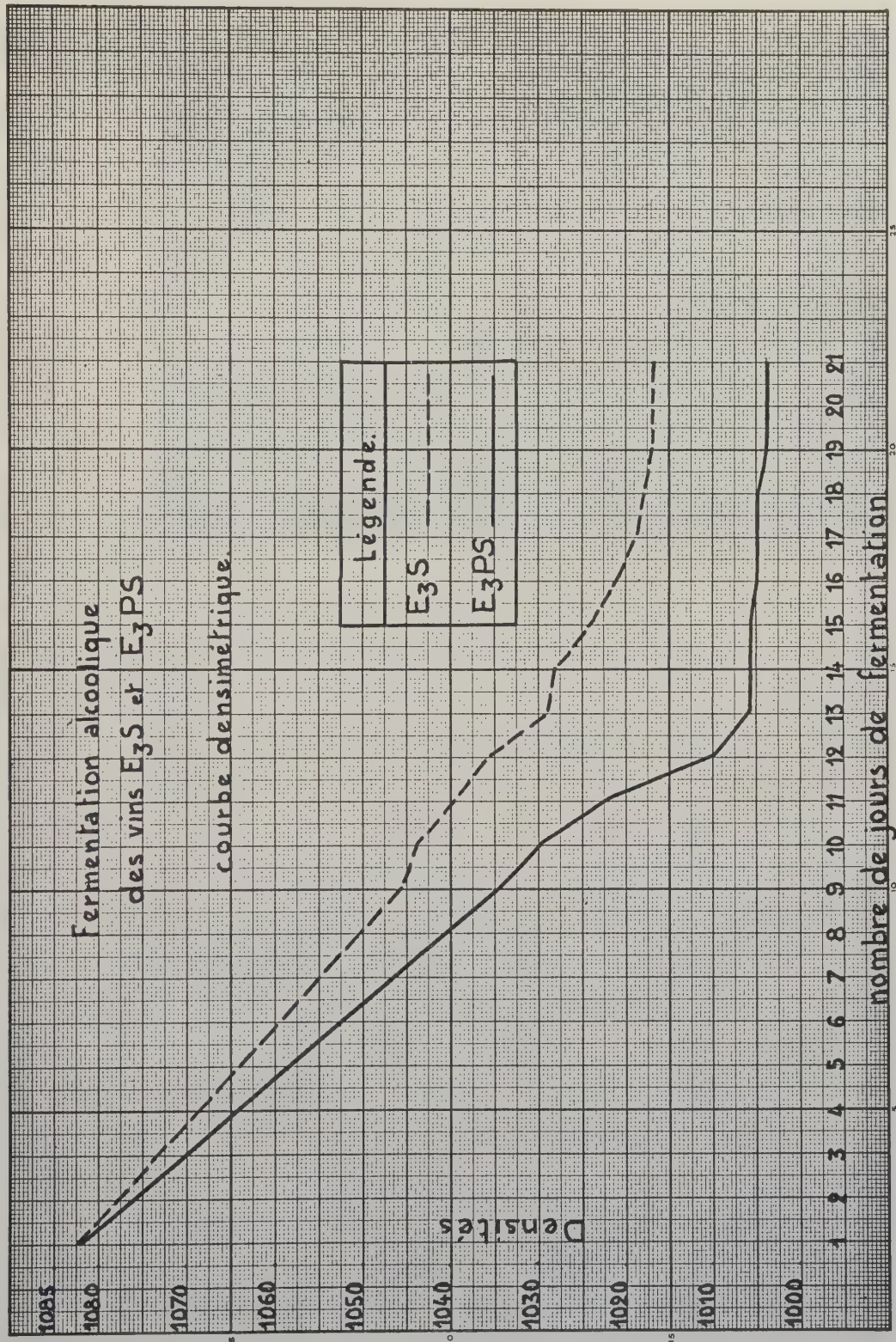


Fig 66.

représentée figure 66 permet de comparer les deux vitesses de

transformation des sucres. La différence d'évolution de la ferment-

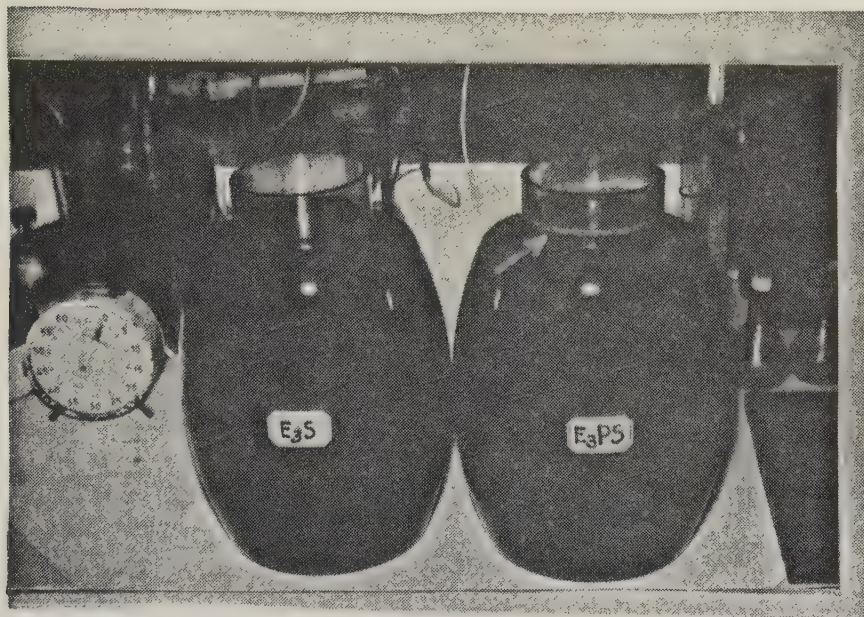


Fig 67.

tation est aussi observable sur la figure 67; le flacon E_3PS présentant une mousse abondante signe d'une bonne prolifération de levures. (→)

On peut donc conclure à un effet activateur de notre procédé.

3) DEDUCTIONS & CONCLUSIONS

DE NOS TRAVAUX PRECITES.

Avant de poursuivre la description des autres expériences que nous avons réalisées, il est préférable de tirer au clair les déductions premières de nos recherches.

Après les études d'orientation, les essais B et T nous ont montré que notre technique de vinification permettait de diriger une fermentation alcoolique sous potentiel oxydo-réducteur inférieur à celui obtenu par les méthodes traditionnelles d'élaboration des vins. Cette propriété procure au moût et au vin une grande résistance à l'oxydation. Ces résultats représentent déjà un gros avantage pour nos types de vins secs.

De plus, par notre principe, on garde pendant et après la fermentation alcoolique un pH bas, puisque l'on bloque la décarboxylation de l'acide malique. La limpidité obtenue est inhérente à une fermentation résultant d'un développement de levures non accompagné de prolifération bactérienne.

Ces deux séries d'expériences B et T, avec les es-
sais P éclairent un peu le problème de la consommation d'azote
par les bactéries malolactiques. Nous savons que celui-ci restait
assez obscur, puisque très récemment CORDONNIER (207) s'expri-
mait de la façon suivante :«L'indice de la fermentation malolacti-
que sur la composition en acides aminés du vin n'est pas nette...»
(Bulletin de l'Office International de la Vigne et du Vin N° 430
Décembre 1966). Nos études permettent d'observer une carence en
aminoacides provoquée par notre procédé, carence dirigée en parti-
culier sur l'arginine et l'alanine.

Les essais D, H et P; en dehors de la présentation des
avantages tirés de notre conduite de vinification; mettent en re-
lief le rôle important joué par l'arginine comme stimulant des
bactéries malolactiques. Les travaux sur le pressurage que nous
mentionnons plus loin, en offrent une preuve indiscutable.

Enfin, la levure n'est pas aussi grande consommatrice
d'arginine, que l'on a tendance à le croire, puisque cet élément
n'est pas toujours utilisé par cette première. On n'observe pas
d'effet stimulant vis à vis de ce microorganisme.

L'explication biochimique du mécanisme d'action de
notre technique, réside dans la carence obtenue en aminoacides.
(arginine et alanine).

L'activation que fournissent ces deux éléments se
trouve prouvée par l'exposé des travaux qui vont suivre.

Chapitre 6

Etudes sur le pressurage

des raisins

Nous avons été amenés à la mise en route de ces recherches par le fait observé que les jus de fin de serrage du pressoir ont une forte prédisposition à la rétrogradation malolactique, malgré un taux élevé de polyphénols.

Il était fort intéressant de chercher quels étaient les facteurs activateurs de ces bactéries lactiques, capables systématiquement de provoquer la décarboxylation de l'acide malique.

Connaissant certains de ces facteurs par nos recherches précédentes, nous nous sommes efforcés de les retrouver dans ces essais et les résultats ont confirmé les hypothèses émises.

Les analyses que nous plaçons ici, ont fait l'objet, en partie, de publications antérieures: GENDRON(I93)(I93 bis).

1) ESSAIS "L."

Nous avons commencé des travaux en 1963 sur récolte de Muscadet, dont le but était de connaître la composition azotée des jus de différents serrages et celle de la cuvée au fur et à mesure de son remplissage. Parallèlement une observation micro-biologique des phénomènes fermentaires était assurée.

§ 1. MATERIEL.

Cette mise au point a été facilitée par l'emploi de matériel de pressurage moderne, permettant d'isoler les différents jus facilement.

Le pressoir était d'un modèle horizontal, comportant 6 serrages espacés par un arrêt et un rebêchage. Les serrages 1 et 2 étaient jumelés ainsi que 3 et 4. Le serrage 5 indépendant ainsi que le serrage 6. Le pressoir était chargé par l'intermédiaire d'un foulpompe recevant la vendange directement de la

vigne par des charettes équipées de bennes étanches. (vendange non foulée à la vigne). Il est bon de citer au passage, que nous avons observé dans cette expérience un potentiel d'oxydo-réduction particulièrement bas, qui provenait de l'excellent moyen de transport des raisins.

Les déterminations d'azote nous ont fourni la valeur de cet élément dans les jus de serrages pris individuellement, compte tenu des jumelages; et dans la cuvée à mesure de son remplissage par l'écoulement des jus.

Le pressoir était placé sur une cuverie en sous-sol. La maie située sous ce premier était en ciment recouvert de mosaïque, elle était munie d'un système d'obturation qui permettait, après homogénéisation, le prélèvement de chaque serrage et ensuite l'incorporation de ce dernier avec le jus de goutte ou avec le jus de goutte augmenté des serrages précédents.

§ 2. RECHERCHES.

a) Biochimie.

Les prélèvements furent effectués sur les lieux mêmes du pressurage, les flacons furent portés aussitôt au laboratoire et stabilisés à l'anhydride sulfureux. Le jus de chaque serrage fut homogénéisé dans la maie de réception avant prise d'échantillon; ces différents lots sont représentés par $L_{(a)}$, $L_{(b)}$, $L_{(c)}$, $L_{(d)}$. Ensuite chaque jus de serrage fut incorporé avec le jus de goutte augmenté des serrages précédents, c'est l'évolution de la cuvée. Pour cela on recueillait les jus dans une cuve située sous la maie et communiquant avec celle-ci.

Au fur et à mesure du pressurage des raisins on a obtenu les échantillons: L , L_2 , L_4 , L_5 , L_6 .

Les références des lots sont donc établies comme suit:

- L = Jus de goutte.
- L₂ = Jus de goutte + serrage 1 et 2
- L₄ = Jus de goutte + serr.I et 2 + serr.3 et 4.
- L₅ = Jus de goutte + serr.I et 2 + serr.3 et 4 + serr.5
- L₆ = Jus de goutte + serr.I et 2 + serr.3 et 4 + serr.5 + serr 6.
- L_(a) = Serrages I et 2 groupés.
- L_(b) = Serrages 3 et 4 groupés.
- L_(c) = Serrage 5
- L_(d) = Serrage 6.

Pour vérifier et prouver notre technique de vinification, nous avons appliqué celle-ci sur des jus identiques à L, L₂, L₄, L₅, L₆; et que nous avons référencés de la façon suivante:

- M = Jus identique à L auquel on a ajouté les produits issus de notre technique de vinification soit : 150 mg/l phosphate di-ammonique + 250 mg/l tanin de noix de galle + 37,5 mg/l d'anhydride sulfureux.
- M₂ = Jus identique à L₂ auquel on a ajouté les produits issus de notre technique de vinification (voir M).
- M₄ = Jus identique à L₄ auquel on a ajouté les produits issus de notre technique de vinification. (voir M)
- M₅ = Jus identique à L₅ auquel on a ajouté les produits issus de notre technique de vinification. (voir M)
- M₆ = Jus identique à L₆ auquel on a ajouté les produits issus de notre technique de vinification. (voir M).

Au point de vue aspect, la couleur des jus va en croissant depuis L jusqu'à L₆; (l'ensemble de la cuvée).

L'augmentation de coloration est très importante dans les jus de serrages de L_(a) à L_(d). Celle-ci est due à l'apport de tanins physiologiques.

En limpidité, le trouble va croissant et suit la

même évolution, bien que la concentration en fer total n'excède pas 7 milligrammes par litre. Ce trouble n'est vraisemblablement pas imputable à une casse ferrique.

Nous avons cherché à connaître la répartition des aminoacides dans ces jus non fermentés ainsi que le taux de matières azotées.

La chromatographie bi-dimensionnelle selon la première technique décrite, fut appliquée sur ces 9 échantillons; mais nous avons été obligés de grouper certains aminoacides principaux au cours de la lecture.

Groupe A.....Arginine et alanine
Groupe B Leucine et Phénylalanine.
C.....Acide glutamique.
D.....Glycocolle.

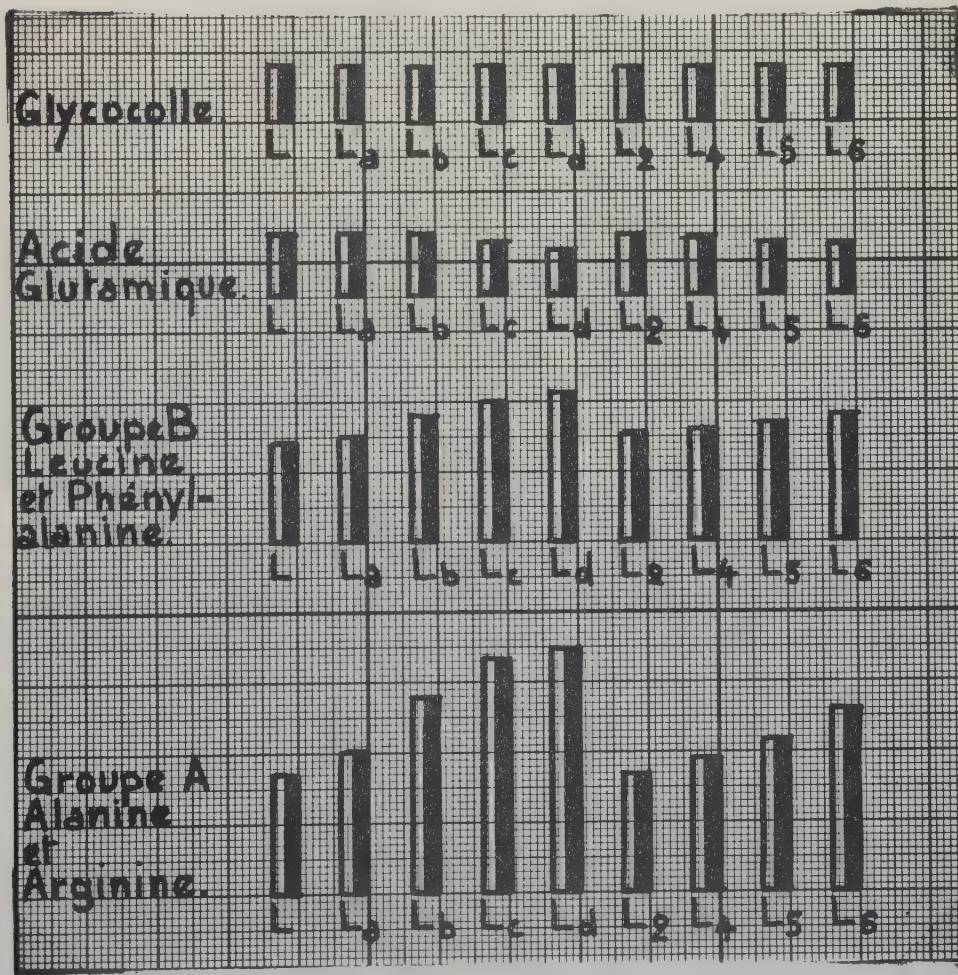


Fig 68.

Les résultats de ces analyses sont consignés dans le graphique de la figure 68.

Au cours du pressurage on peut donc observer une augmentation du groupe arginine et alanine, ainsi que du groupe leucine et phénylalanine; une légère diminution de l'acide glutamique et un taux constant de glycocolle. L'arginine par son augmentation compense largement l'abaissement du taux de l'acide glutamique puisque, comme l'indiquent CARLES et M.LAMAZOU-BETBEDER (22) elle représente à elle seule le cinquième de la masse des aminoacides du moût. RIBEREAU-GAYON et PEYNAUD (208) ont reconnu également que l'arginine était l'acide aminé prépondérant des moûts.

Sur les mêmes moûts nous avons cherché à connaître parallèlement la teneur en azote organique.

Références	AZOTE TOTAL en mg/l	AZOTE MINERAL mg/l	AZOTE ORGANIQUE mg/l
L ..	688,8	156,8	532,0
L _(a) ..	756,0	159,6	596,4
L _(b) ..	784,0	156,2	627,8
L _(c) ..	819,0	155,6	663,4
L _(d) ..	855,4	160,7	694,7
L ₂ ..	728,0	155,6	572,4
L ₄ ..	729,4	156,0	573,4
L ₅ ..	756,0	155,7	600,3
L ₆ ..	756,0	150,0	606,0

(Tableau L III)

Le tableau L III, et par déduction le graphique de la figure 69, nous prouvent bien l'exactitude des valeurs émises par les résultats de la chromatographie, en comparaison avec les chiffres d'azote organique.

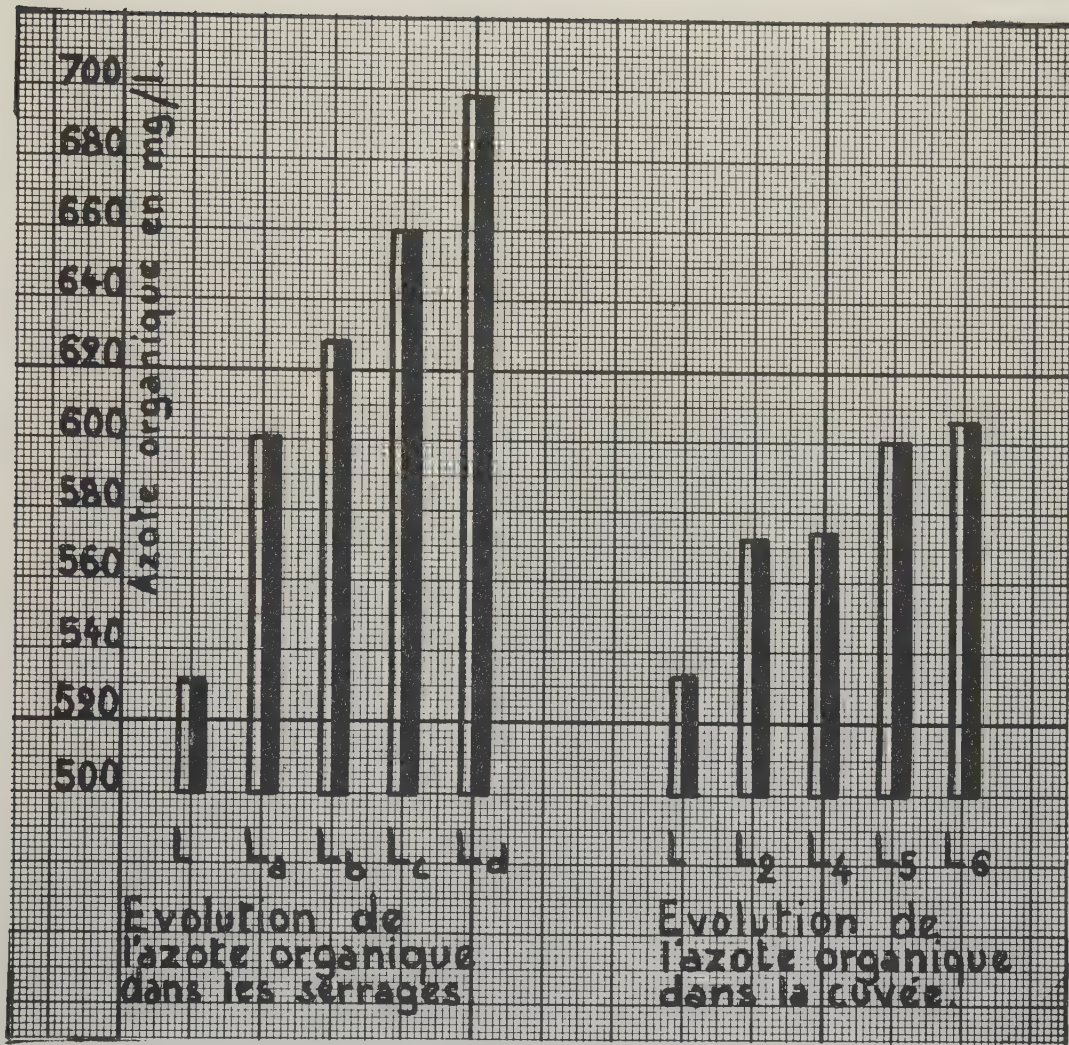


Fig 69.

Désirant approfondir davantage ce problème, nous avons traité les échantillons L_2 , L_4 , L_5 , L_6 et le serrage 5 soit $L_{(c)}$ par notre procédé de préparation que nous avons développé dans le chapitre des Méthodes analytiques, à la rubrique "aminoacides": méthode personnelle bi-dimensionnelle ascendante. Après élimination des matières pectiques notre technique nous a fournit d'excellents résultats; ce qui nous a permis de chiffrer en milligrammes les aminoacides pris isolément. Le tableau LIV nous indique ces valeurs, les graphiques présentés figure 70 nous montrent schématiquement les variations.

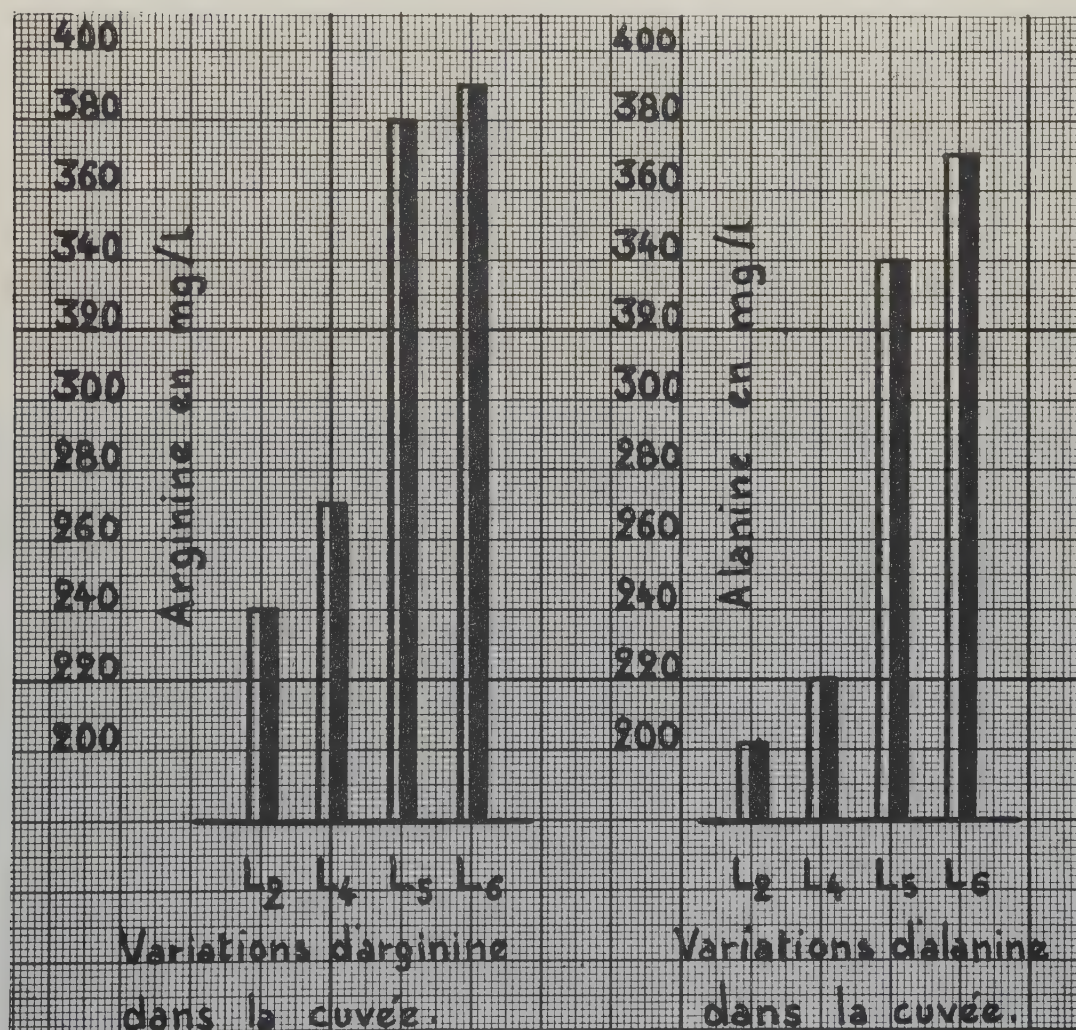


Fig 70

Références.	ARGENTINE en mg/l	LEUCINE en mg/l	ALANINE en mg/l	PROLINE en intensité.
L ₂	240	400	200	xx
L ₄	270	100	220	xx
L ₅	380	140	340	xx
L ₆	390	440	370	xx
L(c)	400	90	240	x

(Tableau IIV)

Les deux séries chromatographiques et les déterminations d'azote organique corroborent notre première opinion, à savoir: augmentation d'arginine et d'alanine de façon importante au fur et à mesure du pressurage des raisins.

b) Microbiologie.

L'étude de la fermentation malolactique sur ces flacons, nous assure du rôle activateur des éléments aminoacides. Nous rappelons que la série L représente les jus du pressoir tels, et que la série M les mêmes jus prélevés en double sur lesquels nous avons appliqué notre technique propre de vinification.

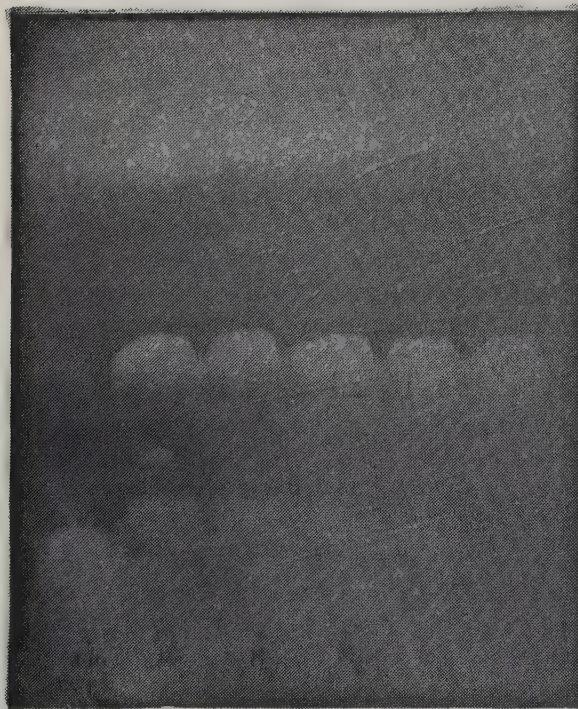


Fig 71

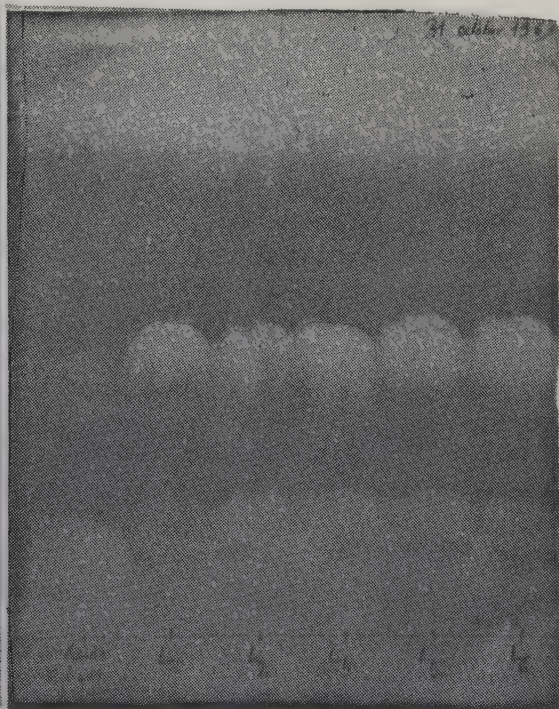


Fig 72

La composition de l'acidité de titration au départ des essais, nous est donnée par les chromatographies représentées Figures 71 et 72 . Un mois après, on peut noter un départ de fermentation malolactique dans la série L, et plus particulièrement dans les fin de serrages. Fig 73 et 74. La série M n'a subi aucune évolution.

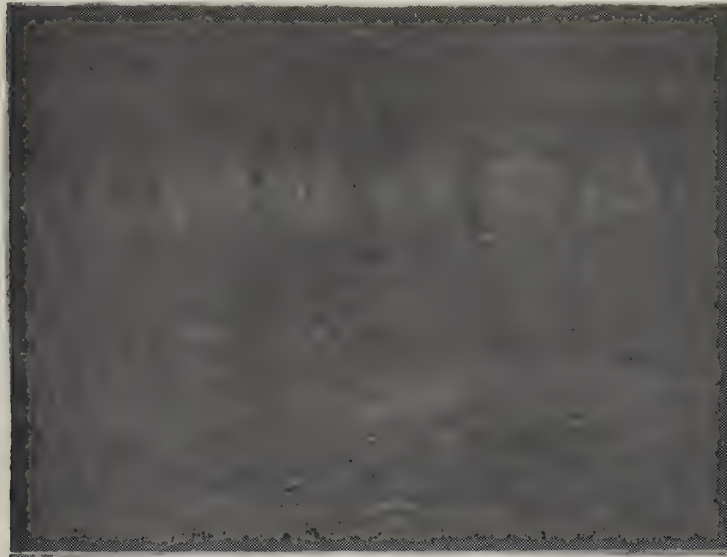


Fig 73



Fig 74.

Ce commencement de dégradation de l'acide malique déjà

observé figure 74 se confirme, et la figure 75 présente une décarboxylation complète de cet élément dans la série L, pour les lots L₅ et L₆.

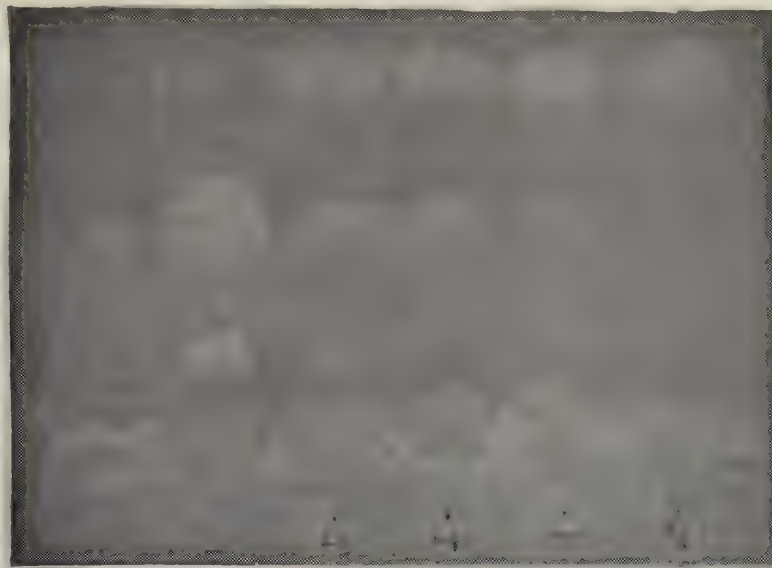


Fig 75.

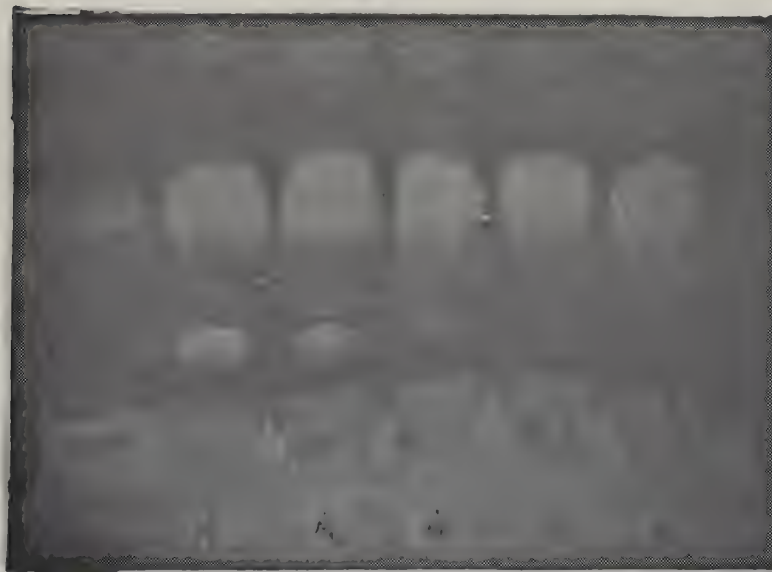


Fig 76.

L'application de notre technique sur la série M n'a pas donné lieu à une décomposition de l'acide malique. On peut constater ce résultat par l'examen de la figure 76 qui montre une chromatographie effectuée à la même date que celle de la figure 75.

§ 3. CONCLUSIONS.

De nos travaux nous pouvons tirer trois déductions:

- 1°) Le pressurage des raisins provoque un apport d'arginine et d'alanine. Ce dernier augmente progressivement en fonction du serrage
 - 2°) Ces deux aminoacides ont une action très favorable sur le déclenchement de la retrogradation malolactique.
 - 3°) Notre technique de vinification appliquée sur les mêmes jus de raisins, inhibe l'action stimulante de ces deux aminoacides.
-

2) ESSAIS "F."

§ 1. PREPARATION DU MATERIEL.

Dans cette seconde étude du pressurage, nous avons opéré également sur un pressoir horizontal, sans foulopompe, avec cette fois des prélèvements simplement sur le jus de goutte et sur les jus issus des serrages. Le travail du pressoir était décomposé en six temps (aucun groupement de serrages). Voici le classement et les références des échantillons:

F = Jus de goutte.

F₁ = Serrage 1

F₂ = Serrage 2

F₃ = Serrage 3

F₄ = Serrage 4

F₅ = Serrage 5

F₆ = Serrage 6

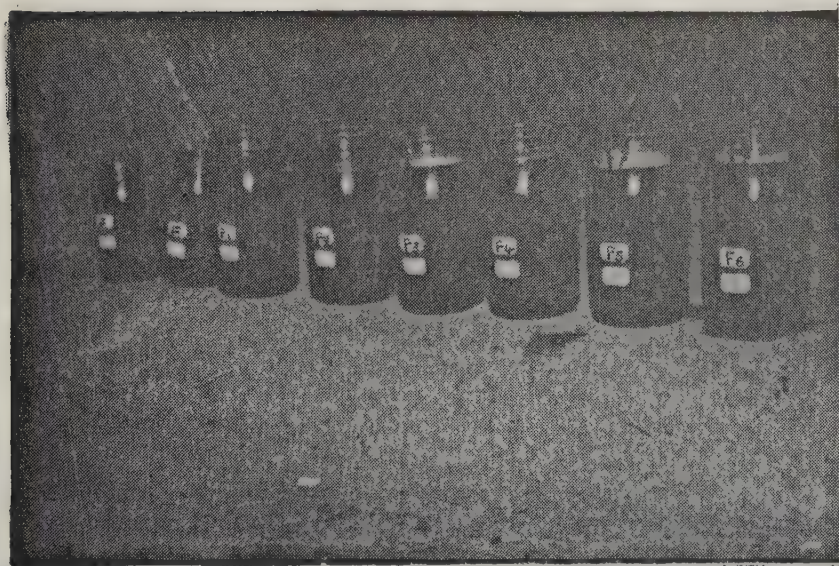


Fig 77

Pour confirmer l'expérimentation de 1963 dans un autre sens, nous avons en 1965 étudié la répartition des aminoacides sur les vins fermentés provenant des prélèvements cités plus haut.

2. R E C H E R C H E S .

a) B i o c h i m i e .

Aussitôt la fin de fermentation alcoolique, une partie aliquote fut prélevée dans chaque flacon et stabilisée à l'anhydride sulfureux pour éviter toute altération microbienne ultérieure. En effet comme nos recherches biochimiques portent sur la connaissance

du stock aminoacide, il est indispensable de titrer ces éléments avant fermentation malolactique puisque désormais nous savons que ces derniers sont consommés par les bactéries de cette dégradation.

Ce protocole d'essais a l'avantage d'éviter toute préparation d'échantillons avant chromatographie; on opère directement sur le vin. Cette méthode nous a déjà donné de très bons résultats; elle est possible par la très faible teneur en sucre des Muscadets, (moins de 2 gr/l) après fermentation.

Le graphique de la figure 78 et le tableau IV nous fournissent les chiffres obtenus dans cette série de recherches. Ces derniers sont illustrés par les figures 79,80,81,82,83,84.

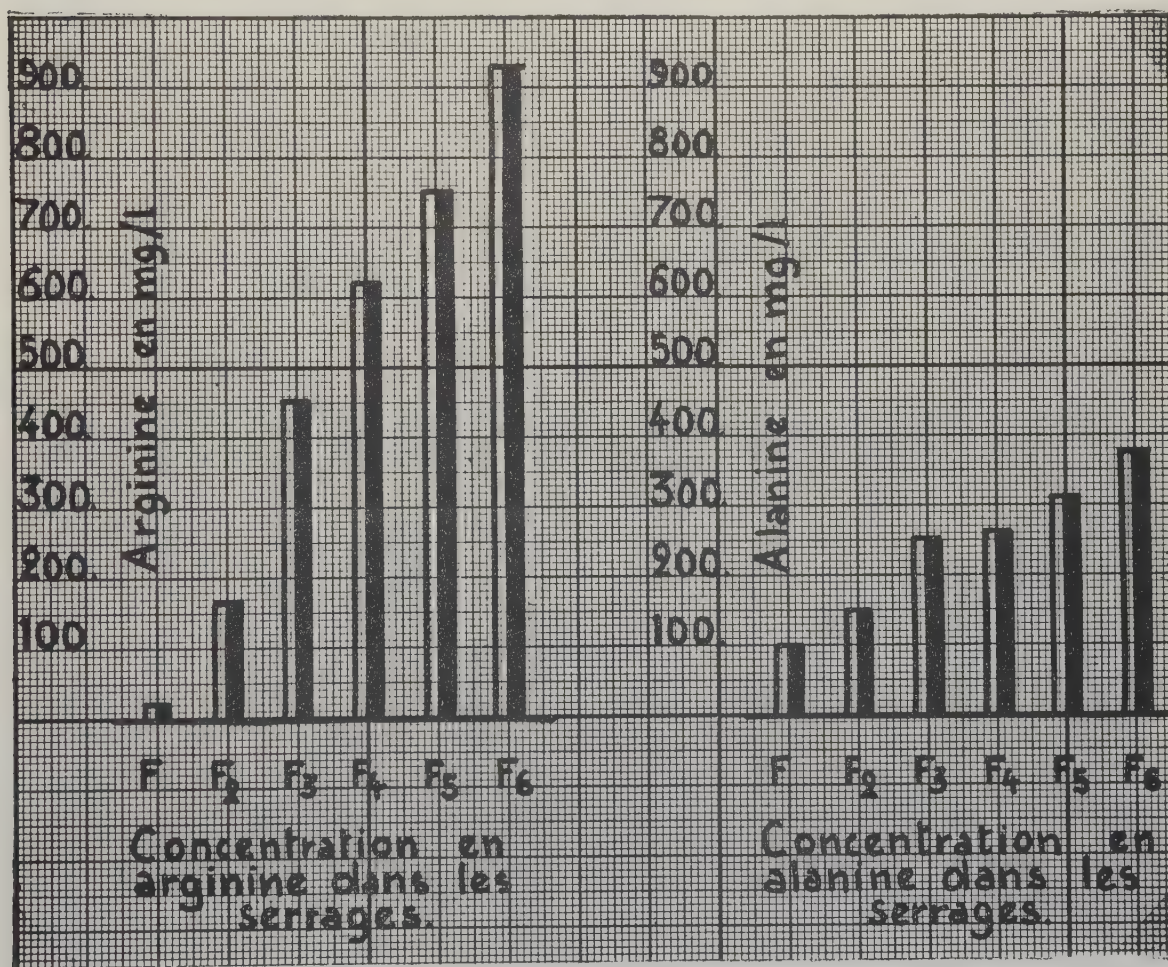


Fig 78.

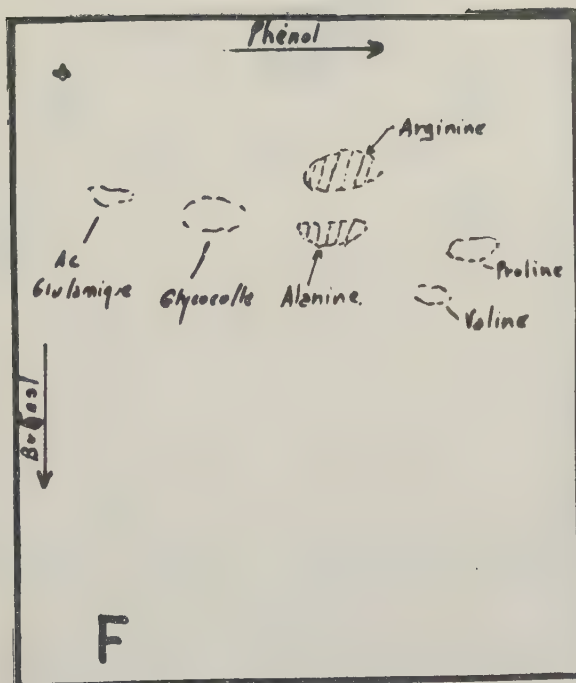


Fig 79

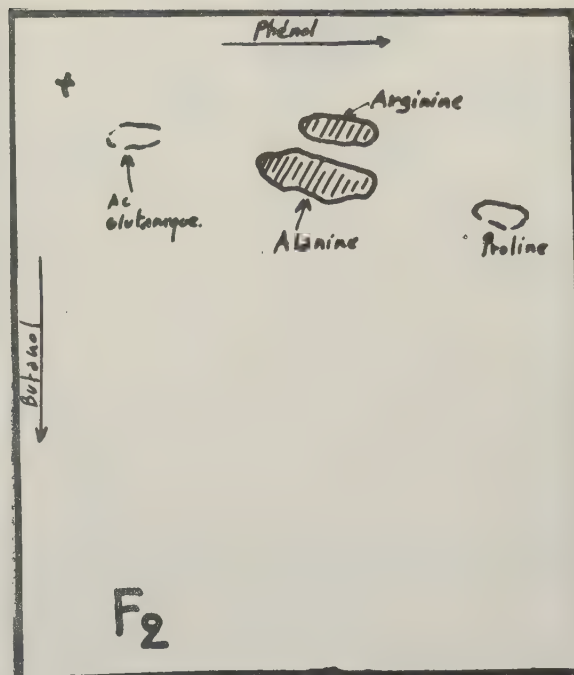


Fig 80

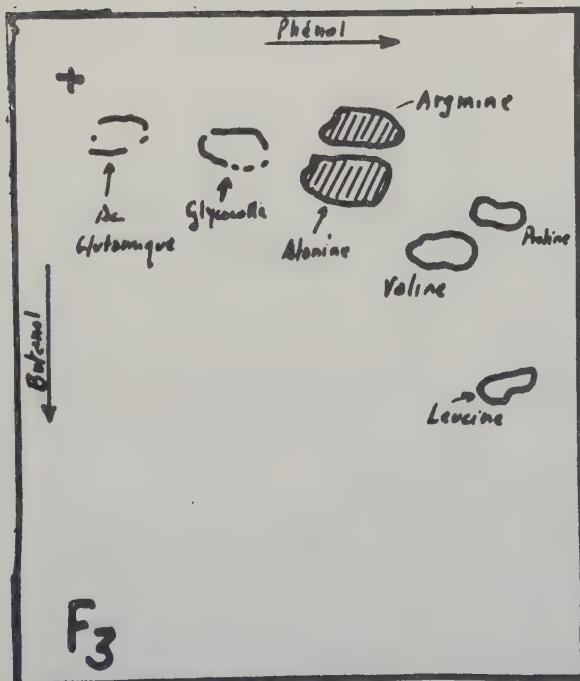


Fig 81

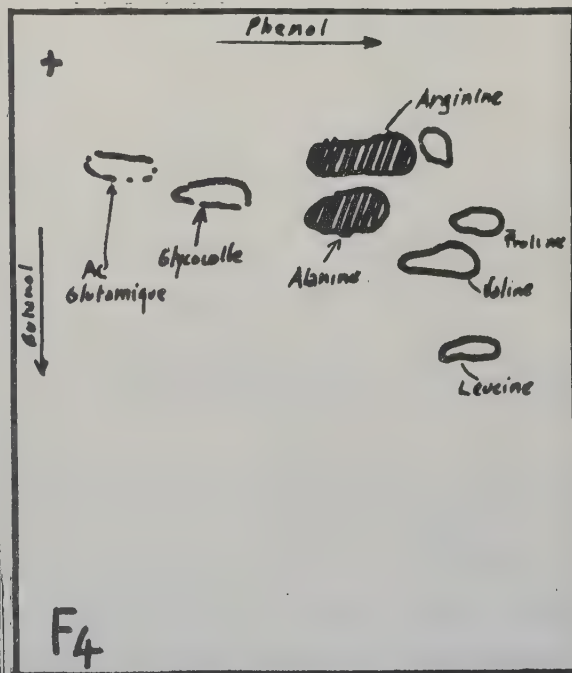


Fig 82

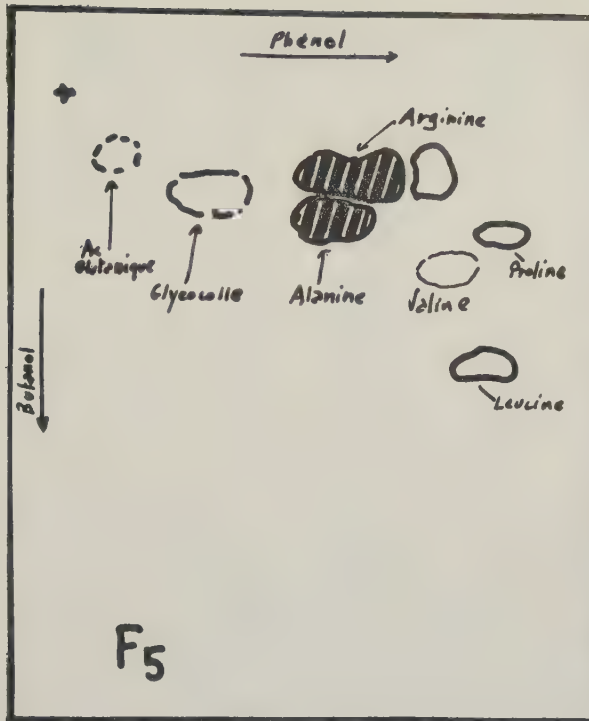


Fig 83

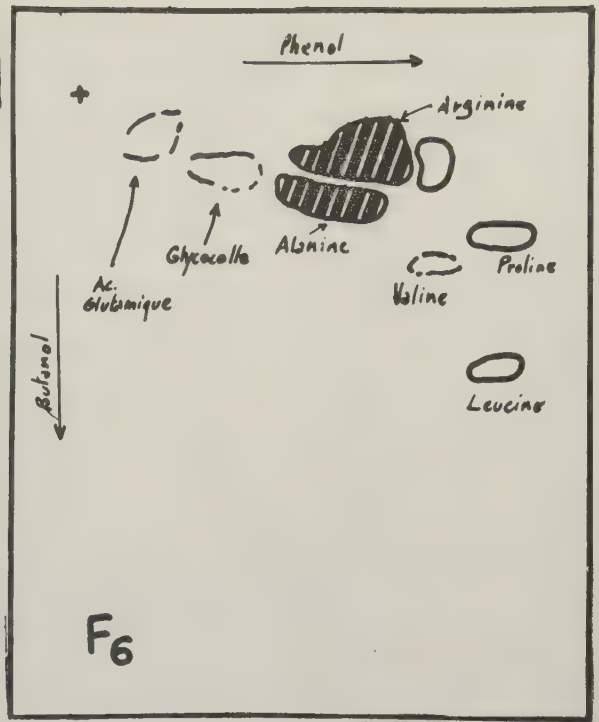


Fig 84

Références	ARGININE en mg/l	LEUCINE en mg/l	ALANINE en mg/l	PROLINE en intensité	VALINE en intensité
F	traces	50	100	XXXX	x
F ₂	175	traces	150	xxx	traces
F ₃	450	90	250	XXXX	xxx
F ₄	625	87	260	xxx	XXXX
F ₅	<u>750</u>	62	<u>312</u>	xxx	xxx
F ₆	<u>937</u>	125	<u>374</u>	XXXX	

(Tableau L V)

Comme on peut le constater, l'augmentation d'arginine est importante dans les serrages. (Jus de goutte = traces, serrage 6 = 937 mg). Au cours du pressurage des raisins l'enrichissement en arginine est plus important que celui en alanine, qui cependant reste considérable ;(Jus de goutte = 100 mg, serrage 6 = 374 mg).

Ces valeurs se sont nettement confirmées par les chiffres d'azote organique obtenus sur ces vins; nous les reproduisons ci dessous.

Références	AZOTE TOTAL mg/l	AZOTE MINERAL mg/l	AZOTE ORGANIQUE mg/l
F	170,08	16,80	153,28
F ₁	271,60	29,68	241,92
F ₂	308,00	38,64	269,36
F ₃	343,00	40,60	302,40
F ₄	432,60	45,36	387,24
F ₅	506,80	60,20	446,60
F ₆	604,80	57,40	547,40

(Tableau L V I)

b) B o t a n i q u e .

Sur ce plan, nous avons pensé que l'apport d'acides provenait de l'écrasement et de la lacération de la râfle. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons prélevé des râfles dans le pressoir en fin de travail. Après avoir éliminé les parties les plus sèches, nous avons passé au pilon 5 gr de râfle. Le jus ainsi obtenu fut étendu à 20 ml avec de l'eau distillée et après décantation naturelle, chromatographié selon les techniques précédemment citées. Au développement, nous avons pu effectivement observer des taches importantes et difficiles à chiffrer, pour l'arginine et l'alanine. Il semble donc que la râfle soit le siège des aminoacides libérés ensuite dans le jus de raisin après compression des cellules végétales de cette première. Cette conclusion est en accord avec l'étude de CARLES, M.LAMAZOU-BETBEDER et R.PECH (210). Ces chercheurs ont observé que les vins rouges sont plus riches en azote que les vins blancs car leur contact avec les parties solides de la vendange est plus long dans la vinification en rouge. Par contre on se trouve en désaccord avec la publication de S.LAFON-LAFOURCADE et PEYNAUD(209) qui ont trouvé que la macération de la vendange avec la râfle (pendant 4 jours de cuvaison à chapeau flottant) ne modifiait pas la composition azotée du vin de goutte ou du vin de presse.

Il serait nécessaire d'étudier systématiquement du double point de vue histologique et histoohimique la localisation de ces aminoacides dans la râfle en fonotion du degré de pressurage. C'est un travail de recherches que nous avons l'intention d'entreprendre.

**c) Influence des aminoacides
libérés.**



Fig 85.

Pour suivre l'évolution de la fermentation malolactique ainsi que celle de la fermentation alcoolique, les prélèvements furent placés dans des bocaux de 2.000 ml à très large ouverture et que nous représentons figure 85. Une couche d'huile de vaseline neutre

déposée à la partie supérieurs du moût protégeait celui-ci d'une oxydation exagérée.

Les caractéristiques analytiques de ces moûts au début des essais sont données dans le tableau DVII; la composition de l'acidité totale est observable sur le chromatogramme de la figure 86.

Références	pH	E _C en mv.	rH	Acidité de titration en G/l (exp en H ₂ SO ₄)
F	2,80	+360	28,2	8,30
F ₁	3,00	+340	27,2	8,40
F ₂	2,75	+360	28,2	8,70
F ₃	2,85	+350	28,15	8,40
F ₄	3,00	+330	27,4	8,00
F ₅	3,20	+325	27,3	7,70
F ₆	3,50	+300	26,4	6,70

(Tableau L VII)

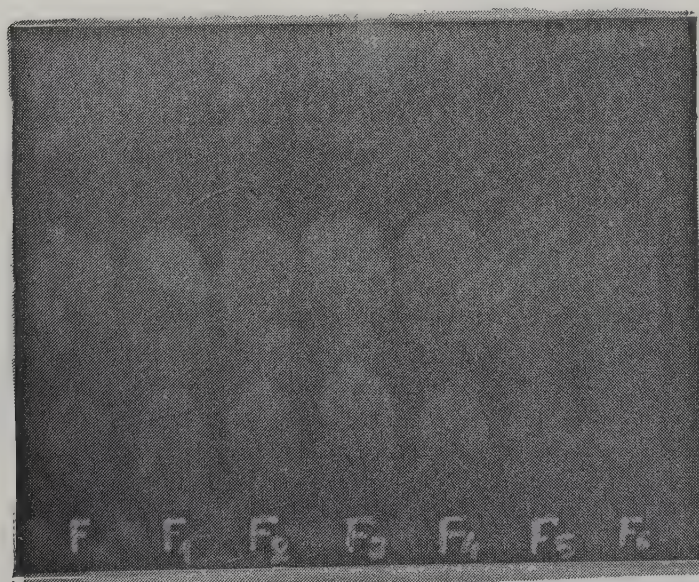


Fig 86.

Au vingt quatrième jour d'expérimentation, les échantillons F₄, F₅, F₆ laissent apparaître une rétrogradation malolactique bien que pour ces vins la fermentation alcoolique n'est pas terminée.

Cette observation visible sur la figure 87, se trouve confirmée par une chromatographie réalisée 3 mois après le début de nos essais (voir Fig 88).

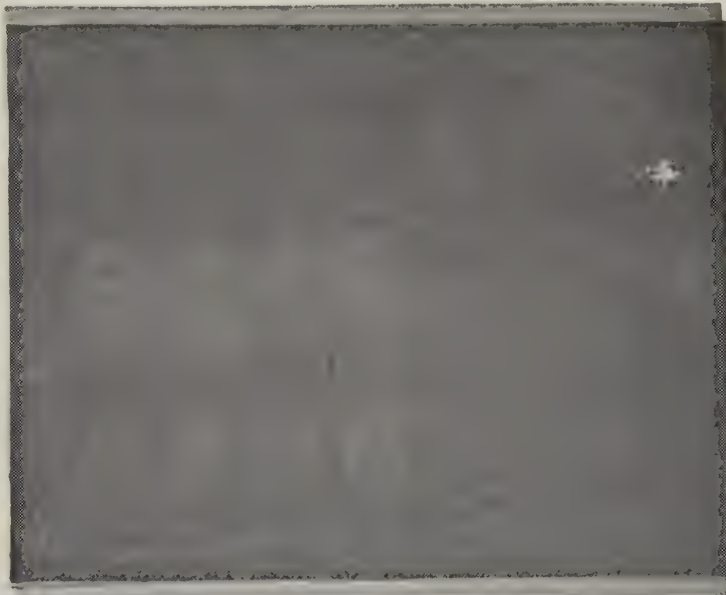


Fig 87

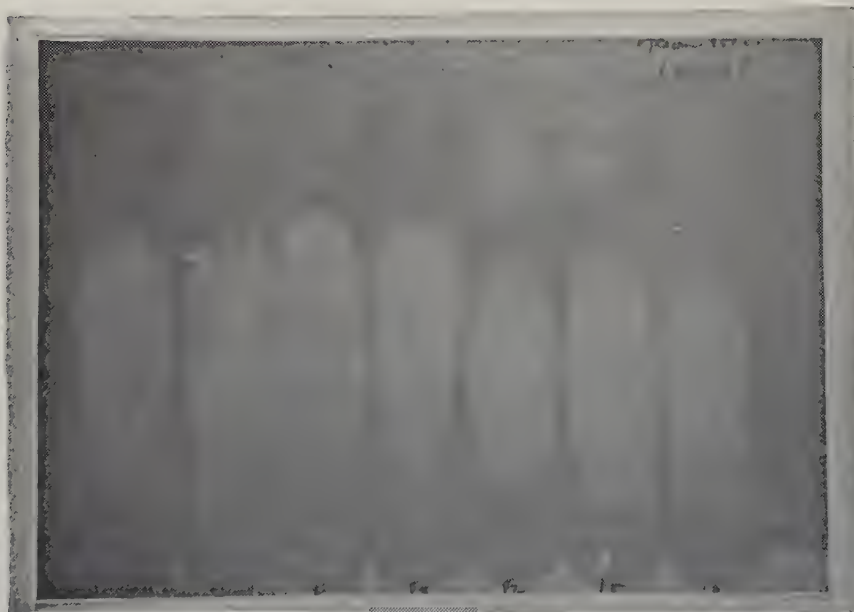


Fig 88.

La facilité de décarboxylation de l'acide malique dans les vins issus des derniers serrages est évidente. On pourrait l'attribuer à un pH plus favorable que dans les vins du jus de goutte par exemple; mais l'apport massif d'aminoacides au cours du pressurage n'est certainement pas étranger à ce déclenchement de fermentation malolactique. D'ailleurs les essais L nous ont montré

également une aptitude pour la cuvée à la rétrogradation malolactique. Cette aptitude n'existe pas tant que les derniers serrages ne sont pas incorporés à l'ensemble. De plus le facteur pH est vraisemblablement à évincer puisque dans les essais L il était commun à tous les échantillons. Le volume de jus représenté par les trois derniers serrages n'est pas suffisant pour modifier de façon sensible le pH de la cuvée.

d) Répercussions sur la

fermentation alcoolique.

Après avoir dressé le bilan de l'apport d'azote conduit par l'enrichissement en arginine et alanine dans les jus de fin de serrage d'un pressoir et étudié l'influence de ces acides aminés sur les bactéries lactiques; il était intéressant de connaître l'action et les propriétés de ces éléments devant la fermentation alcoolique. C'est pourquoi une étude de ce phénomène fermentaire fut menée parallèlement à nos travaux; elle fut brève puisque le problème de la fermentation alcoolique est un peu étranger au sujet que nous traitons.

Nous avons tout d'abord mesuré la densité des moûts journallement, les résultats de ce travail du 5^{ème} au 18^{ème} jour de fermentation sont consignés dans le tableau LVIII.

[illegible]

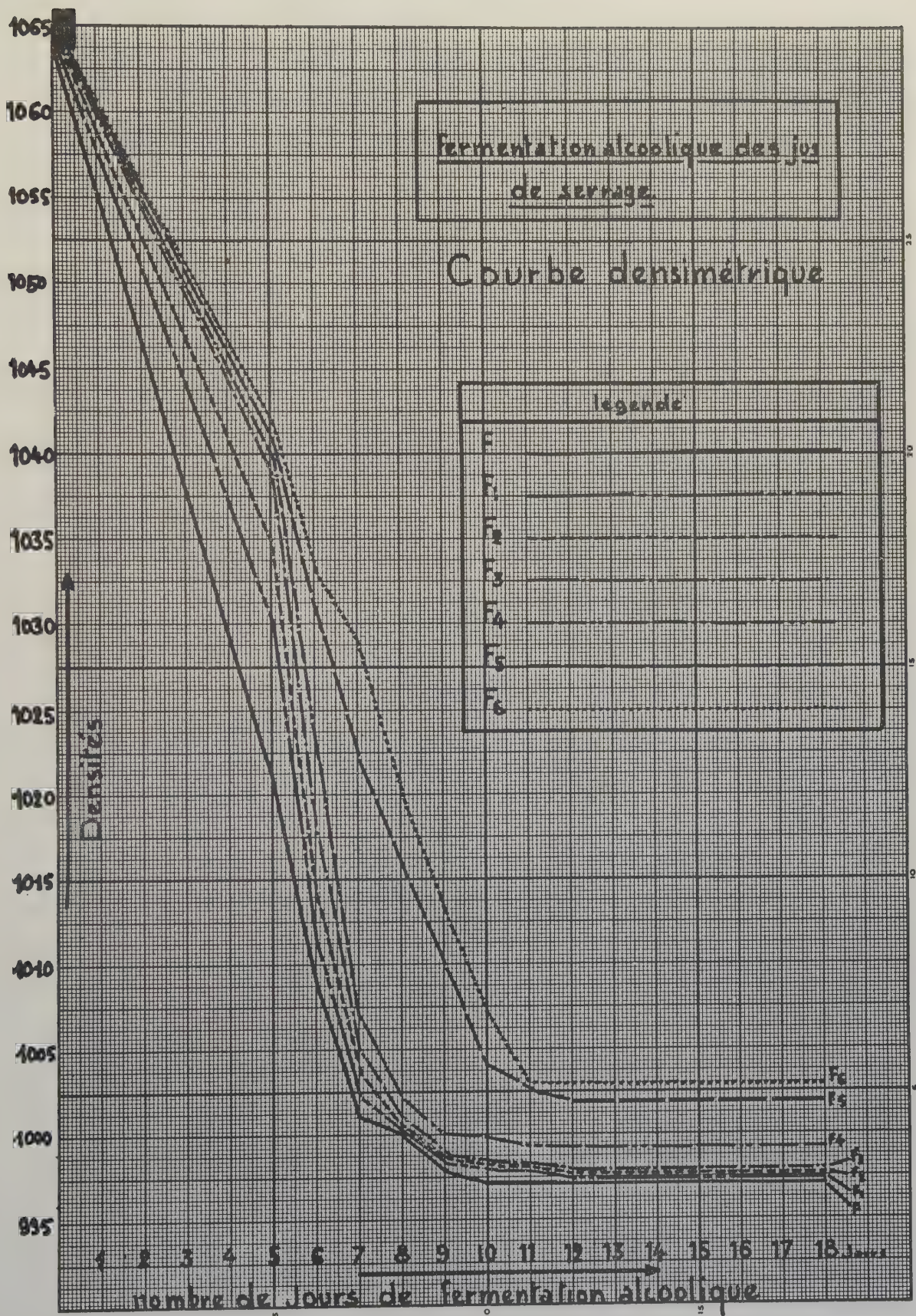


Fig 89.

Les chiffres de ce tableau montrent un ralentissement de fermentation alcoolique (très préjudiciable aux Muscadets) qui est mis en évidence par la courbe de la figure 89.

§ 3 . C O N C L U S I O N S .

Au cours de l'extraction du jus de raisin, et plus particulièrement en fin de pressurage, certaines parties de la râfle sont écrasées et lacérées libérant ainsi de fortes quantités d'ARGININE et d'ALANINE, facteurs activateurs de bactéries malolactiques.

Ces deux aminoacides, loin de favoriser la fermentation alcoolique semblent plutôt l'inhiber.

Cette déduction entrerait en accord avec les conclusions des essais "P", où nous faisons remarquer que la levure ne semblait pas si grande consommatrice d'arginine que l'on a tendance à l'affirmer.

3) ESSAIS "E."

Après l'exposé de ces travaux de recherche sur le pressurage des vins blancs (raisins de Muscadet), nous avons voulu satisfaire notre curiosité et vérifier rapidement les phénomènes déjà cités.

Nous présentons ici, une très courte étude expérimentale sur raisins rouges, confirmant les précédentes.

A cet effet, nous avons utilisé des raisins provenant d'une treille située dans le jardin expérimental du laboratoire. Le total de raisins récoltés était de 17 kg, nous avons pressé ces derniers avec un appareil de laboratoire type cage et vis centrale et que l'on voit sur la figure 90.

Nous avons obtenu 12 litres de moût au cours de ce pressurage divisé



Fig 90.

en 4 temps. Les échantillons E, E_1R , E_2R , E_3R , représentent l'évolution de la cuvée. De chaque serrage nous avons prélevé une très petite quantité de quelques millilitres de moût afin de pouvoir en suivre l'évolution microbiologique; les correspondances sont les suivantes:

E = Jus de goutte.

E₁ = jus de goutte + serrage 1

E₂ = jus de goutte + serr.1 + serr.2

E₃ = jus de goutte + serr.1 + serr.2 + serr.3.

E₁R = serrage 1 (après chaque serrage nous avons effectué un rebêchage).

E₂R = serrage 2

E₃R = serrage 3

Les figures 91 et 92 nous présentent les chromatogrammes des acides organiques au départ de l'expérimentation, c'est à dire aussitôt après le pressurage.



Fig 91.



Fig 92.

Nous avons gardé les flacons en observation, et au bout de trois mois l'évolution des serrages s'est confirmée comme dans le cas des vins blancs. La figure 93 illustre ces faits.



Fig.93.

La composition du jus de goutte (E), contenant vraisemblablement beaucoup moins d'acides aminés ne permet pas une décarboxylation de l'acide malique. Nous avons pensé que le même mécanisme d'alimentation des bactéries fonctionne ici, comme dans nos précédentes recherches.

C h a p i t r e 7

E s s a i s d e m i s e e n

é v i d e n c e d ' u n

a n t a g o n i s m e m i c r o b i e n .

1. PRELIMINAIRES.

Dans nos travaux précédents nous avons expliqué le mécanisme d'action mis en oeuvre par notre conduite de vinification et dont le résultat est l'obtention d'un appauvrissement azoté.

Ce fait se trouve confirmé par les études de pressurage que nous venons d'examiner et qui mettent en relief le rôle joué par certains aminoacides dans la décarboxylation de l'acide malique.

Avant d'arrêter définitivement nos travaux, nous avons cherché à savoir si dans notre méthode d'élaboration des vins, on ne pouvait pas observer de phénomènes propres d'antagonisme microbien.

Pour cela nous avons étudié quel pouvait être l'effet produit sur un moût ou un vin par des substances extraites de levures. Il s'agit de l'effet inhibiteur ou activateur propre à ces substances, vis à vis des bactéries malolactiques.

La comparaison a été faite entre des facteurs extraits de levures ayant participé à une vinification traditionnelle

et ceux extraits de levures ayant contribué à l'élaboration de vins dans des conditions spéciales dont notre technique.

Notre travail comprend donc l'extraction de facteurs endogènes et exogènes à la levure.

2. ETUDE DE FACTEURS

EXTRAITS PAR SOLVANTS

ORGANIQUE.

Nous avons utilisés 4 solvants organiques courants : Acétone, Acétate d'éthyle, Ether de pétrole, Chloroforme. L'agitation de la levure, sans forte pression, avec un solvant fournit les facteurs exogènes à celle-ci. Après cette première extraction et toujours sur la même levure, on procède à la trituration avec broyage en présence de sable de Fontainebleau, les cellules écrasées cèdent les facteurs intracellulaires.

§ 1. MODE OPERATOIRE.

On prélève 10 gr de lie et on y ajoute 25 ml de solvant. On agite dans une ampoule à décanter puis on fait passer le tout sur un filtre plissé Prat-Dumas plissé N°3. On obtient le filtrat "A" qui doit contenir, si il y en a, les facteurs exogènes. Au culot de filtration on ajoute 25 ml du même solvant et 10 gr de sable de Fontainebleau; on passe au mortier et on malaxe fortement. Le liquide se colore et après filtration sur filtre Prat-Dumas plissé N°3, on obtient le liquide "B" qui devrait contenir les facteurs endogènes.

Nous avons réalisé des extractions sur les lies de fermentation des flacons B₁, B₂, B₃, B₄, B₅ (voir les essais B) Pour chaque type de lie nous avons obtenu 8 solutions différentes, ce qui représente en tout 40 flacons pour les 5 bocaux B.

Nous avons appelé par exemple B₁A le filtrat

issu des levures du flacon B₁ et comprenant les facteurs exogènes, B₁B celui provenant des mêmes levures mais contenant les facteurs endogènes. Ces liquides d'extraction sont visibles sur la figure 94, le tableau LIX.

nous donne
leur aspect
après extrac-
tion.



Fig 94.

Solvant	B ₁	B ₂	B ₃	B ₄	B ₅
Acétone A	Clair, jaune foncé	Clair, jaune plus foncé que B ₁	Trouble jaune foncé	Clair jaune foncé	Clair jaune foncé
Acétone B	Clair jaune citron	Clair jaune citron foncé	Clair jaune citron	Clair jaune citron	Evaporé.
Acétate d'éthyle A	Clair jaune citron	Clair jaune citron foncé	Clair jaune citron	Clair jaune d'oeuf	Clair jaune citron pâle.
Acétate d'éthyle B	Clair jaune citron soutenu	Clair jaune citron soutenu	Clair jaune citron	Clair jaune citron soutenu	Clair jaune citron pâle.
Chloroforme A	Clair jaune citron.	Clair jaune pâle	Clair jaune pâle.	Clair jaune citron soutenu	Clair jaune très pâle.
Chloroforme B	Aspect et couleur identiques à Chloroforme A.				
Ether de pétrole A	Clair jaune pâle	Clair blanc-jaune.	Clair blanc-jaune.	Clair jaune pâle	Clair blanc.
Ether de pétrole B	Opalescent jaune citron	Opalescent jaune citron pâle	Opalescent jaune pâle	Opalescent jaune citron	Opalescent jaune citron pâle.

(Tableau LIX)

Nos expériences ont porté simplement sur les facteurs extraits des levures du lot B₁ (vinification traditionnelle) et sur ceux provenant de celles du lot B₄ (vinification selon notre méthode) ; ceci pour tenter de mettre en relief un effet bactériostatique propre aux levures ayant animé la fermentation alcoolique en B₄.

Les extractions ainsi réalisées ne nous ont pas permis de travailler sur les levures pures mais sur la lie. Cependant nous savons par RIBEREAU-GAYON et MAURIE (211) que les matières tannoïdes du vin sont solubles dans l'acétate d'éthyle, de même que l'acétone dissout les leucoanthocyanes. MASQUELIER et POINT (212). De toutes façons la coloration jaune présente dans presque tous les liquides d'extraction n'est vraisemblablement pas due aux tanins oenologiques, puisque le lot B₁ n'a pas reçu ce produit et qu'il offre cependant cette couleur.

Les extraits furent mis à évaporer à 26-27°C (la série à l'acétate d'éthyle évaporée à 95-98°C), et repris par 10 ml d'eau acidulée à 5 o/oo d'acide tartrique. (Ce volume de 10 ml permet de revenir au volume initial de lie).

§ 2. EXPERIMENTATION SUR MOUTS.

(série a)

Sur un moût dont la fermentation alcoolique n'était pas commencée, nous avons placé à raison de 5 % en vol., ces liquides aqueux obtenus selon la technique que nous venons de citer plus haut. (Dans l'ensemble des cas nous avons remarqué que les lies occupent environ 5 % du volume de vin).

Nous avons utilisé pour ce travail des fioles jaugées de 100 ml. Le moût qui y était placé avec son liquide expérimental recevait en plus quelques millilitres d'huile de vaseline neutre pour le protéger d'une oxydation exagérée risquant de fausser l'évolution microbiologique.

La fermentation alcoolique se déclara régulièrement dans tous les échantillons et se termina au bout de 11 jours.

La fermentation malolactique assura la continuité de l'activité biologique et se termina au bout de deux mois dans toutes les fioles, (voir figures 95, 96, 97) ce qui prouve que si il existe un facteur bactériostatique propre aux levures de vinification type B₄, celui-ci n'est pas soluble dans l'eau acidulée à 5 o/oo d'acide tartrique.

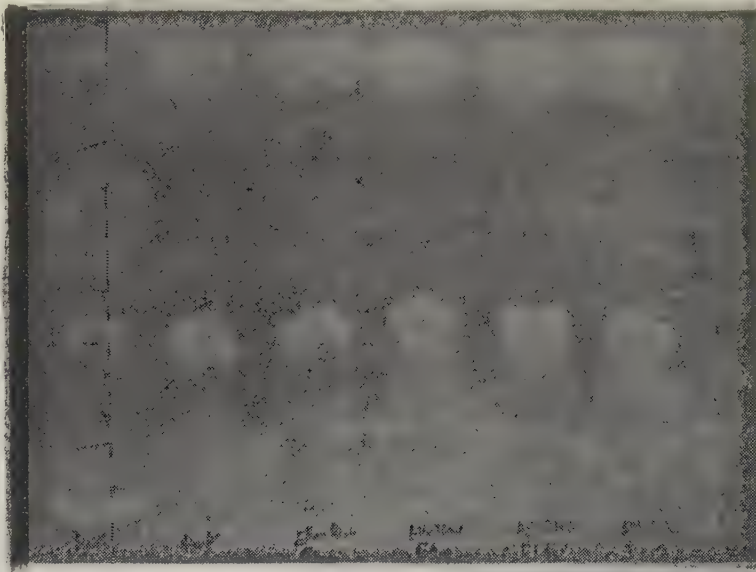


Fig 95



Fig 96



Fig 97

§ 3. EXPERIMENTATION SUR VINS.

(série b)

Pour cette seconde série, nous avons utilisé le reste de nos solutions aqueuses qui avaient été tyndallisées ,en temps voulu. Nous avons repris ces extraits réduits par le solvant dont ils dépendaient initialement. Ces nouvelle préparations furent appliquées directement, sans évaporation préalable, sur un vin en puissance de fermentation malolactique. Chaque solvant pur fut testé dans les mêmes conditions et proportions, que celui contenant les facteurs, de façon à détecter l'action propre de ce solvant.

Les figures 98 à 101 permettent de constater que si il existe un composant doué de propriétés inhibitrices vis à vis des bactéries malolactiques, il n'est pas extractible par l'ether de pétrole.

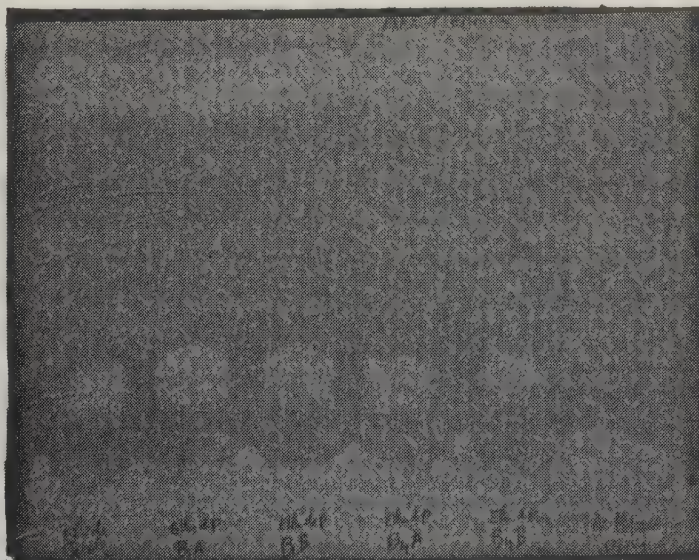


Fig 98



Fig 99

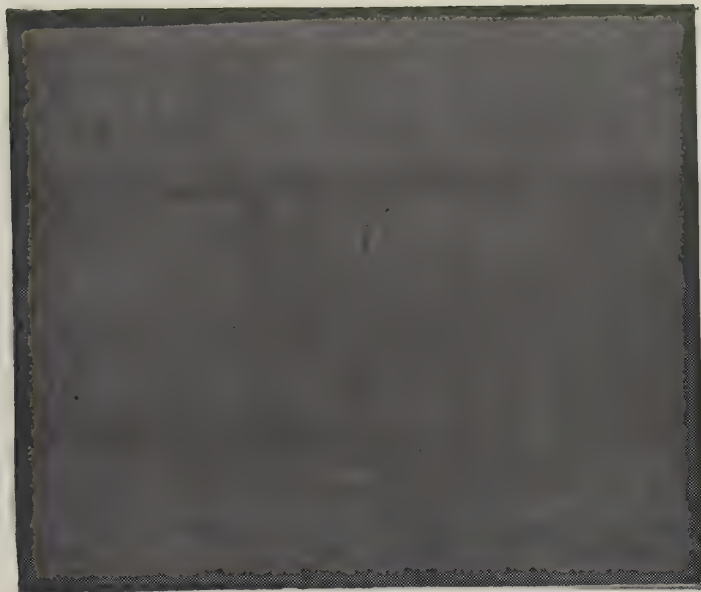


Fig 100.

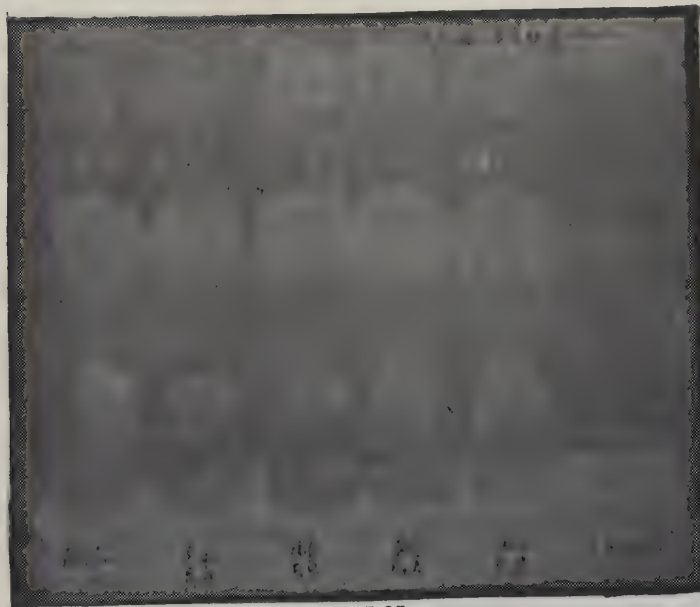


Fig 101.

Nous avons continué l'observation des tests comprenant les trois autres solvants pendant un an.

Les conditions optimales de rétrogradation de l'acide malique furent pourtant tentées en plaçant les fioles à l'étuve bactériologique, (voir Figure 102, au dernier plan) afin de faire évaporer plus rapidement le solvant. Mais il n'a pas été



Fig IO2.

possible de tirer de sûres conclusions, puisque le solvant lui-même semble avoir une action bactériostatique vis à vis des bactéries lactiques du vin.

Les chromatographies présentées dans les figures IO3, IO4 et IO5, ne laissent pas apparaître une action sensible des bactéries sur la décarboxylation de l'acide malique. Cependant avec le chromatogramme de la figure IO3 (extraits à l'acétone) on peut émettre l'hypothèse que ce solvant influence peu le développe-

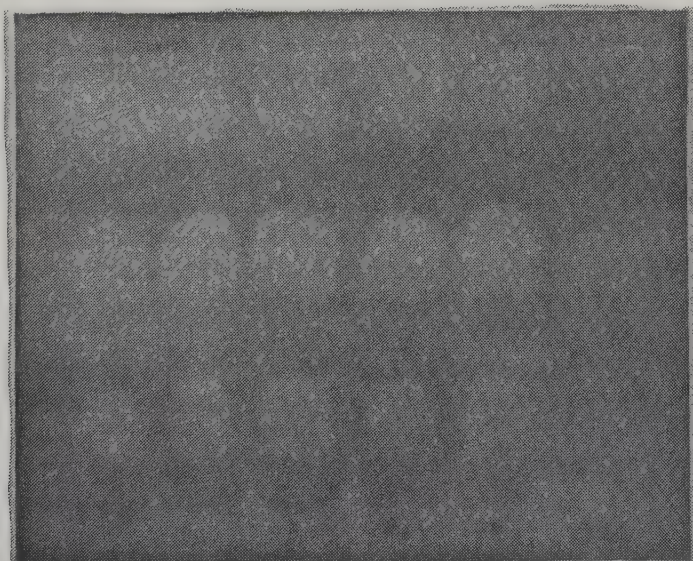


Fig IO3.

ment des bacteries malolactiques. De même il ne semble pas que

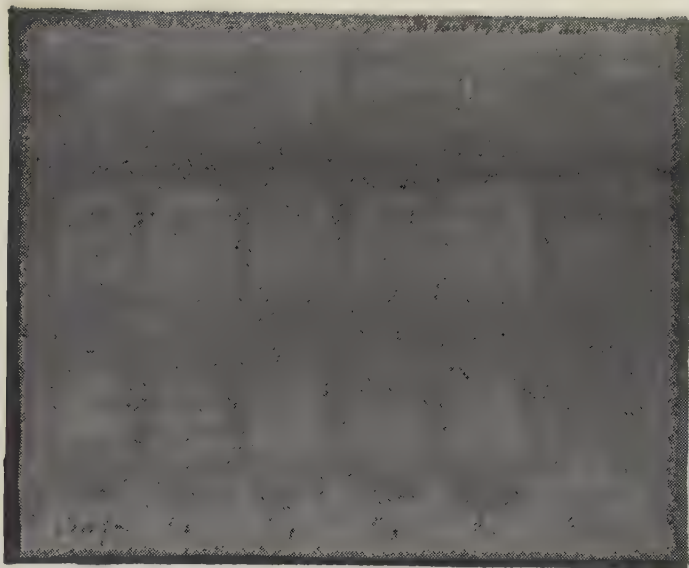


Fig 104.

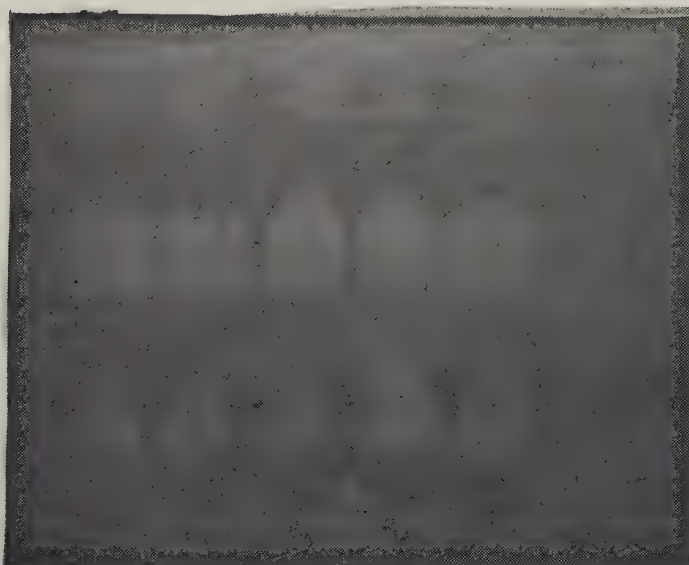


Fig 105.

l'on puisse trouver de principes doués de fonctions inhibitrices
bactériennes, dans les extraits à l'acétone.

3. FACTEURS ISOLES PAR VOIE AQUEUSE.

§ 1. EXPERIMENTATION SUR MOUTS.

Ce dernier travail pour mettre en évidence un effet inhibiteur propre aux levures, si effet il y a, a été réalisé avec des solutions obtenues entièrement par voie aqueuse.

Les lies des vins expérimentés aux essais B, avaient été conservées dans l'eau pendant un an. Cette eau contient un forte dose d'anhydride sulfureux pour éviter son altération. Nous avons voulu savoir si la levure au cours de son autolyse, cédait des principes oligodynamiques doués de propriétés spécifiques vis à vis des bactéries lactiques du vin.

Nous avons ajouté 10 ml de cette solution aqueuse à 100 ml de moût. Les 5 flacons des essais B nous ont donc fourni cinq types de lies, donc cinq tests: B_1K , B_2K , B_3K , B_4K , B_5K .

La figure I06 présente la répartition des acides organiques dans ces essais.

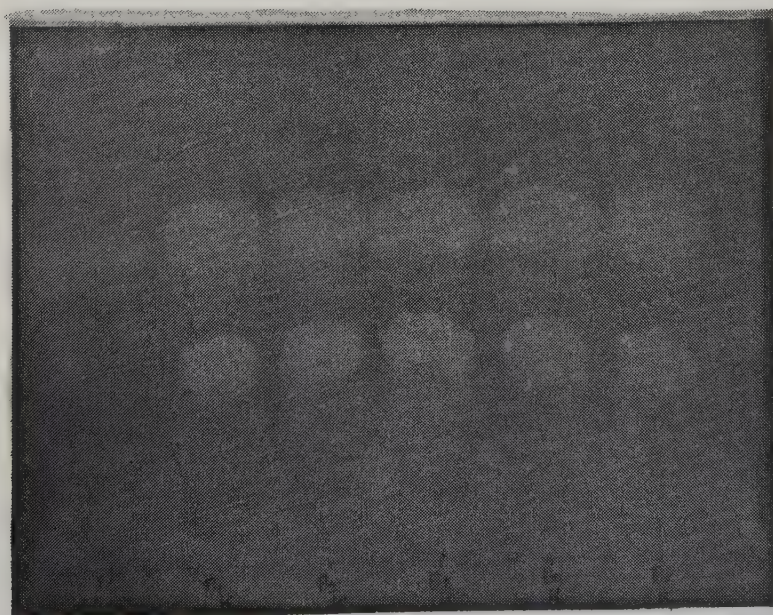


Fig I06

Au bout de deux mois d'observation nous avons constaté que tous les lots, sauf B.K, ⁴⁻présentaient une décarboxylation complète de l'acide malique. (Figure IO7)

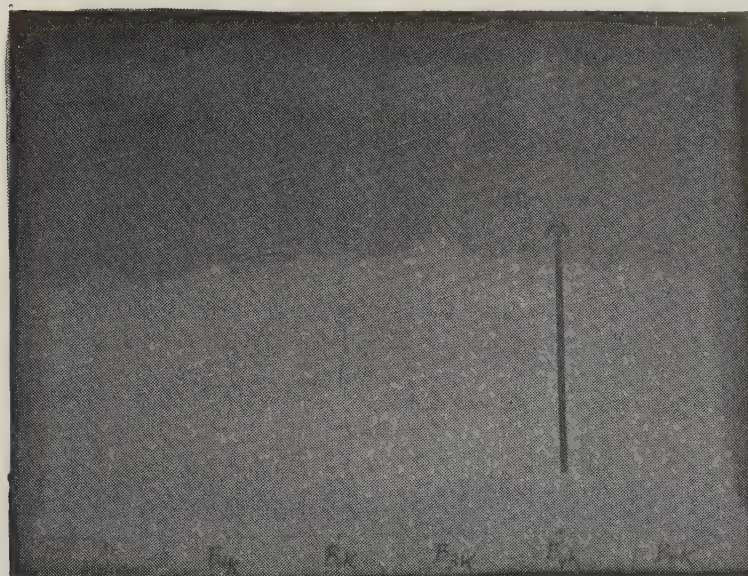


Fig IO7.

Il semble donc qu'il y ait quelques principes oligodynamiques dans la solution dérivant par extraction des levures de vinification selon la technique B₄, qui est la nôtre. Ce premier résultat s'est trouvé confirmé dans l'essai qui va suivre et qui est la répétition de celui-ci, mais sur vin au lieu de moût.

§ 2. EXPERIMENTATION SUR VINS.

Ces essais, que nous avons référencés B₁Y à B₅Y, utilisent les mêmes solutions aqueuses, incorporées à un vin dont la fermentation malolactique était quelque peu commencée.

La figure IO8 fait paraître l'équilibre de l'acidité de titration au cours des essais, après deux mois d'expérimentation.

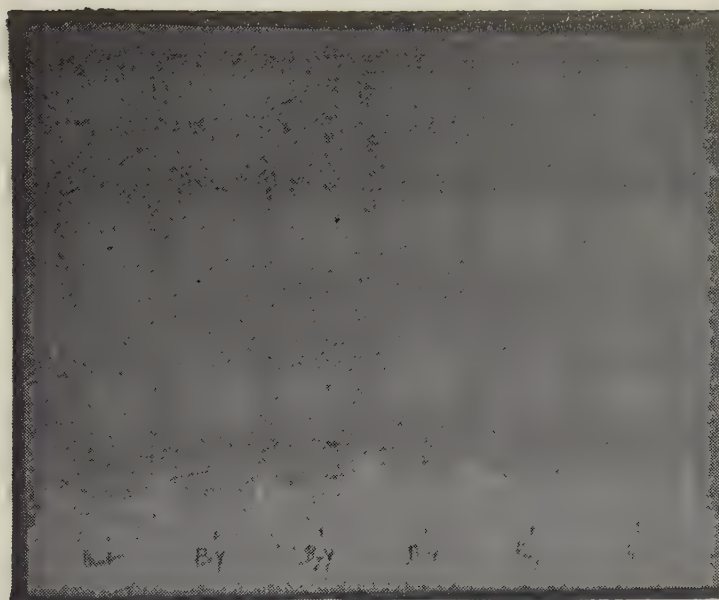


Fig 108.

A partir de ce laps de temps l'évolution fut assez rapide dans la dégradation de l'acide malique et sur la figure 109 le retard à cette décomposition pour les échantillons B_3Y et B_4Y est facilement reconnaissable.

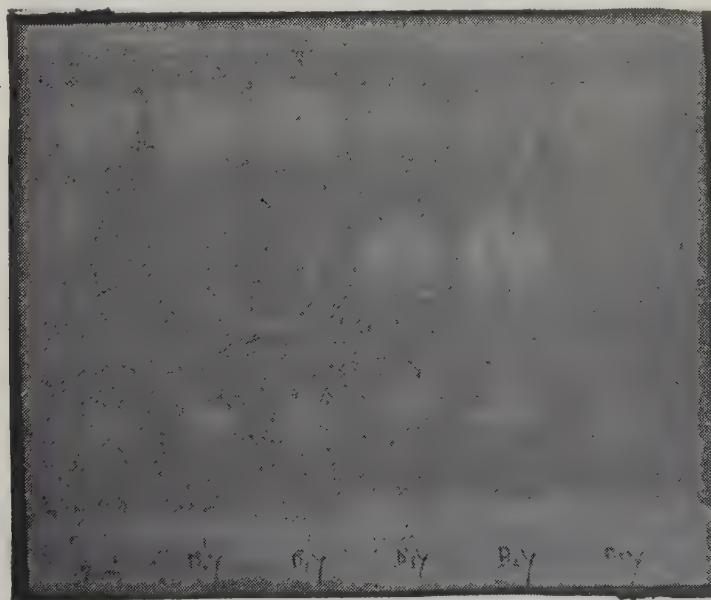


Fig 109.

Il peut sembler paradoxal que les types B_3 et B_4 soient possesseurs des mêmes facteurs ou de facteurs doués de propriétés semblables, mais il faut se rappeler qu'au cours des essais B , le vin en B_4 représentait notre technique et que celui dont le comportement était le plus proche se trouvait être le vin B_3 .

Il faut repenser plus particulièrement au potentiel oxydo-réducteur de ces deux vins pendant leur fermentation alcoolique.

L'évolution se poursuivant, nous avons continué l'observation de ces deux lots, et la figure 110 du dernier chromatogramme permet d'apprécier une différence dans la rétrogradation de l'acide malique.

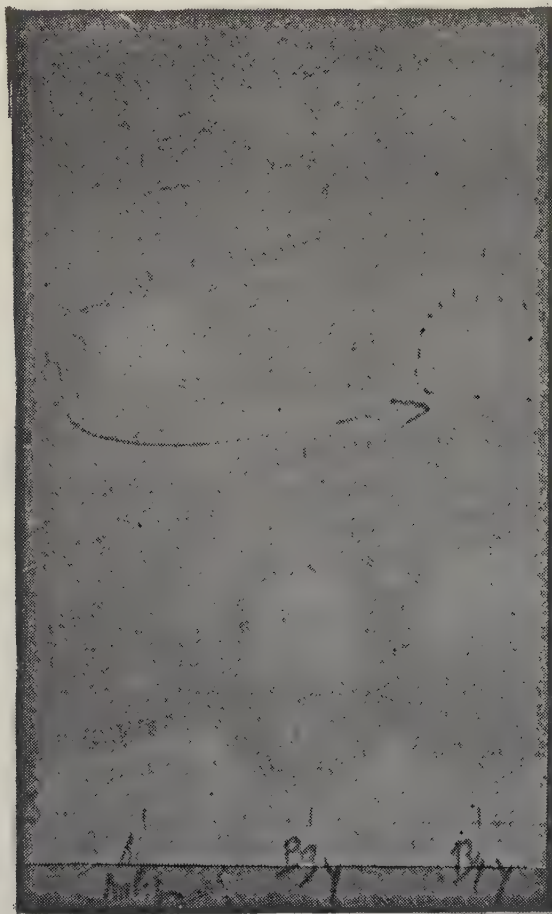


Fig 110.

Le retard à ce phénomène est très perceptible dans le cas de B₄Y.

L'effet inhibiteur observé en B₄Y n'est pas imputable vraisemblablement à une teneur en azote différente pour cet échantillon. Les titrations de cet élément effectuées sur les eaux de conservation des lies offrent peu de variation d'un cas à l'autre, le tableau LX permet ces comparaisons.

Références	AZOTE TOTAL mg/l	AZOTE MINERAL mg/l	AZOTE ORGANIQUE mg/l
Eau B ₁ =A ₁	1183,0	100,8	1082,2
Eau B ₂ =A ₂	1337,0	76,7	1260,3
Eau B ₃ =A ₃	1240,4	125,7	1114,7
Eau B ₄ =A ₄	1155,0	116,2	1038,8
Eau B ₅ =A ₅	1148,0	102,2	1045,8

(Tableau LX)

Il semble peu probable que l'écart des deux chiffres d'azote organique entre B₄ et B₅ (7 mg de différence pour une teneur de 1000 mg) puisse provoquer un comportement spécial pour l'un d'eux.

L'influence de l'anhydride sulfureux contenu dans ces eaux de conservation des lies est à exclure, par les valeurs trouvées d'une part (voir tableau LXI) et aussi par le fait du petit volume incorporé au vin.

Références	pH	Anhydride sulfu- reux total.	Anhydride sulfu- reux libre.	Acidité totale. (en H ₂ SO ₄)
Eau B ₁ =A ₁	3,80	368,64	57,0	3,35 g/l
Eau B ₂ =A ₂	4,30	588,80	21,7	3,40 g/l
Eau B ₃ =A ₃	4,20	496,64	82,0	3,80 g/l
Eau B ₄ =A ₄	4,15	441,60	77,0	3,55 g/l
Eau B ₅ =A ₅	4,30	465,92	18,0	3,15 g/l

(Tableau LXI)

L'addition de ces solutions étant effectué à raison de 10 %, il en résulte un apport de 7,7 mg/l dans le vin traité avec A₄, ce qui est insignifiant. L'anhydride sulfureux total se trouvant à concentration plus faible en A₄ que en A₅, la perturbation se ferait plutôt en sens inverse.

§ 3. CONCLUSIONS.

De ces expérimentations réalisées sur moût et sur vin avec des solutions contenant des facteurs isolés par voie aqueuse, il semble que l'on puisse émettre la théorie suivante.

Tout se passe comme si une substance bactériostatique exogène à la levure et extractible à pH 4,00 par l'eau acidifiée à l'acide sulfureux, agissait sur les bactéries lactiques. Cette substance est élaborée seulement par les levures dont la multiplication est dirigée selon notre technique propre de vinification.

Ces recherches sont préliminaires, il faudrait évidemment les compléter par un travail plus approfondi (avec d'autres solvants). C'est ce que nous nous proposons d'entreprendre dans un très proche avenir.

TROISIEME

PARTIE

DISCUSSION

&

CONCLUSIONS GENERALES

D I S C U S S I O N .

§ 1. Notre méthode de vinification.

Après quelques recherches d'orientation, nous avons présenté dans les essais B et T une méthode de vinification qui bloque la décarboxylation de l'acide malique. Cette technique, qui à notre connaissance est la première ayant une action dans ce but, nous l'avons développée et expliquée en temps voulu, mais nous nous devons de la comparer et de l'analyser par rapport aux recherches ayant un lien plus ou moins direct avec ce sujet.

L'interprétation que nous avons été en mesure de vérifier se traduit par la constatation d'une carence obtenue en arginine et alanine. Nous savons que ces deux aminoacides, avec la proline, sont primordiaux en oenologie. Bien des auteurs ont souligné leur présence surtout par la place qu'ils prennent dans la constitution de l'azote organique. Nous pouvons citer les travaux de PRILLINGER (213) et ceux plus récents (1965-66) de TERCELJ (214)(215). Cet auteur dans plusieurs analyses, nous présente des chiffres élevés pour ces éléments; 500 mg/l en moyenne pour l'arginine et la proline, 160 mg/l pour l'alanine, alors que les autres acides aminés avoisinent une concen-

tration de 50 mg/l en général.

Cet appauvrissement provoqué dans notre conduite de vinification, dépend vraisemblablement de la levure. OPARINE (216) a indiqué que cette dernière consommait les aminoacides d'une manière sélective; de plus Y.SCHAEFFER (217) a montré la facilité d'adaptation des champignons à divers milieux. Dans cet ordre d'idées, la publication de PEYNAUD et S.LAFOURCADE (218) sur les équilibres vitaminiques de la levure, peut nous éclairer. Dans leur étude, une citation des travaux de SCHOPFER (219) nous a frappés: « Une cellule vivante possède un équipement de vitamines qui, normalement, doivent se trouver entre elles dans un état d'équilibre quantitatif. Si, utilisant des organismes auxohétérotrophes, on intervient en paralysant la biosynthèse d'une vitamine par un inhibiteur bien choisi ou en neutralisant une vitamine par un antagonisme spécifique, on relève une hypervitaminose pour certaines vitamines, tandis que d'autres sont synthétisées en quantités plus faibles. Le blocage d'une vitamine se répercute profondément sur le métabolisme de toutes les autres et bouleverse le stock vitaminique de la cellule. » On peut très bien transposer cette théorie aux aminoacides.

PEYNAUD et S.LAFOURCADE ont également étudié ces interrelations vitaminiques sur les levures, c'est ce qui nous fait penser que les mêmes déséquilibres puissent se produire dans la répartition des acides aminés.

D'ailleurs les mêmes chercheurs (PEYNAUD et S.LAFOURCADE)(220) cinq ans après ont fait des observations semblables : « Les levures excrètent des quantités notables d'aminoacides qualitativement variables suivant la nutrition azotée, et qu'il ne faut pas confondre avec les produits d'autolyse des levures. »

Le tannage de la paroi de la levure ne serait peut-être pas étranger à cette carence en aminoacides que nous obtenons. RIBEREAU-GAYON et PEYNAUD(12) dans leur remarquable ouvrage, ont fait mention de ce corps comme élément ralentisseur des échanges de la cellule avec le milieu. FERENCZY (223) d'ailleurs nous précise qu'en fin de fermentation alcoolique une partie des acides aminés produits par la levure repassent dans le vin.

De toutes façons, l'alimentation azotée des levures

conditionne celles-ci dans l'élaboration de produits secondaires comme l'ont montré RIBEREAU-GAYON, PEYNAUD et GUIMBERTEAU (221). Si dans l'étude de ces produits secondaires il n'est pas fait mention des amino-acides, il est facile de concevoir que des répercussions sur ces derniers se produisent aussi. L'abaissement du taux de ces éléments (aminoacides) n'est obtenu dans notre technique, que si l'apport des facteurs que nous avons expérimentés se fait avant le départ de la fermentation alcoolique. Or FERNBACH (194) nous a fait savoir que la levure utilisait l'azote surtout au début de sa vie. Il semble donc que les variations de concentration d'aminoacides observées, soient dépendantes pour une certaine part de l'azote ajouté et plus particulièrement du phosphate di-ammonique. Les besoins de la levure en phosphore sont de plus, assez élevés (BIZEAU) (222).

Enfin, un phénomène qu'il ne nous a pas été possible de contrôler, pourrait renforcer les effets de notre méthode de vinification, il s'agit de la riboflavine.

S. LAFOURCADE et PEYNAUD (189) ont étudié la synthèse de cette vitamine du groupe B (vit. B₂) et après avoir indiqué que celle-ci était un facteur prépondérant pour le développement des bactéries lactiques, ils ont fait remarquer que sa formation était plus élevée en aérobiose. De même les levures oxydatives, type Pichia, Hansenula, Candida sont les meilleures productrices. Comme notre technique de vinification abaisse sérieusement le potentiel d'oxydo-réduction pendant la fermentation alcoolique, la concentration en riboflavine doit être vraisemblablement beaucoup plus faible dans ce vin élaboré selon nos directives.

§ 2 . Rôle de l'arginine en œnologie.

Dans les essais D, H, P, nous avons montré le rôle joué par l'arginine et l'alanine (bien que moins intensément pour ce dernier corps) dans la décarboxylation de l'acide malique. Ces essais se sont trouvés confirmés par les études de pressurage figurant en L et F .

Nous avons déduit de ces recherches que l'arginine

n'était fatalement pas consommée par la levure mais pour la plus grande partie utilisée par les bactéries lactiques. Nous sommes en accord avec les travaux de PEYNAUD et S.DOMERCQ (101) qui précisent que l'arginine est toujours consommée au cours de la fermentation malolactique. Le rapport général de FERENCZY (223) sur les protéines et substances azotées, présenté récemment à l'Office International de la Vigne et du Vin (Novembre 1966), comporte une théorie très en accord avec celle que nous soutenons. FERENCZY en citant le compte-rendu Italien, mentionne que les recherches dans ce domaine concluraient que l'arginine et la proline restent invariables pendant la fermentation alcoolique. WEISS, A.ROUSSET, M.T.MAILLARD et BONNET (224) sont également de cet avis. Par contre nos déductions vont à l'inverse des publications de POUX, FLANZY, FLANZY (225) qui reconnaissent à la levure une grande consommation d'arginine.

§ 3. Point de vue medical.

Du côté médical, que peut on penser de notre technique de vinification ?

Tout d'abord, nous tenons à souligner que les produits oenologiques entrant dans la composition que nous avons établie pour obtenir synergétiquement un résultat, sont reconnus légaux par le Service de la Repression des Fraudes et que de plus les quantités utilisées ici, sont très faibles.

SERVIERE (2)(226) dans une de ses publications, s'exprime ainsi sur le problème des fermentations malolactiques, qu'il appelle à juste titre "dégradations nouvelles". :«...Il devient donc intéressant pour le médecin de se demander si ces dégradations nouvelles constituent un avantage ou un inconvénient pour le corps humain et s'il faut les recommander systématiquement.»

Les recherches de ce médecin expliquent qu'un apport d'acide lactique dans l'organisme humain ne présente aucun avantage particulier; par contre l'acide malique joue un rôle physiologique de premier plan dans le métabolisme intermédiaire, (ensemble des réactions communes aux métabolismes spécifiques: glucidique, protidique, lipidique). Il ajoute que l'action de cet acide malique dans la détoxication ammoniacale a été mise en évidence en pathologie humaine par CACHIN (227) et NORDMANN (228) et que son association avec l'arginine a été utilisée en France par le laboratoire ROQUES.

Dans le cycle, l'acide malique apporte d'une part l'acide α céto-glutarique et d'autre part le D P N réduit, qui est indispensable à l'action de l'acide α céto-glutarique sur la détoxication ammoniacale.

Enfin, SERVIERE citant les travaux cliniques de CACHIN en pathologie humaine, souligne que les rôles respectifs de l'acide malique, de l'arginine et de leur association ont été démontrés ainsi que la guérison de 16 cas de comas hépatiques graves sur 25, au cours de cirrhoses parvenues à un stade désespéré.

Dans notre technique d'élaboration des vins, nous rassemblons ces deux facteurs à la fois: l'acide malique et l'arginine. Certes nous appauvrissons le vin en ce dernier élément azoté, mais comme nous en interdisons la consommation par les bactéries lactiques, cette arginine reste disponible. Alors que dans le cas d'une vinification traditionnelle elle se trouve à plus forte concentration en fin de fermentation alcoolique, mais elle est ensuite consommée en totalité par les bactéries lactiques, et l'acide malique lui est complètement disparu.

§ 4. Remarque particulière.

Sur le plan de la stabilité physico-chimique du vin, nous obtenons avec l'acide malique conservé, une protection vis à vis de la casse ferrique. Ceci a été expliqué récemment par SUDRAUD(229).

C O N C L U S I O N S

G E N E R A L E S .

Ce travail que nous venons de présenter, peut se diviser en deux points.

Dans le premier point, nous avons pu établir et expliquer notre méthode de vinification dans son principe et dans son processus biochimique.

Dans le second nous avons approfondi l'étude du phénomène malolactique en montrant le rôle primordial de l'ARGININE dans cette dégradation biologique.

En résumé, nos recherches ont autorisé les conclusions suivantes:

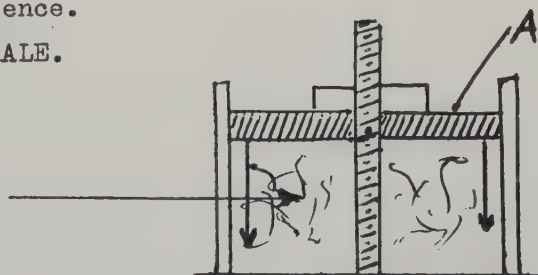
- 1° MISE AU POINT D'UNE METHODE D'ELABORATION DES VINS SECS, EN BLOQUANT LA RETROGRADATION MALOLACTIQUE: CETTE TECHNIQUE PERSONNELLE EST, A NOTRE CONNAISSANCE, LA PREMIERE ORIENTEE DANS CE SENS. L'ACTION ORIGINALE DE CELLE-CI, RESIDE DANS L'OBTENTION D'UNE CARENCE EN ARGININE. L'APPAUVRISSMENT EN CET AMINOACIDE EST REALISE EN AUGMENTANT LA CONSOMMATION DE LA LEVURE EN CET ELEMENT, PUIS EN FREINANT LES ECHANGES DE CE MICROORGANISME AVEC LE MILIEU.
- 2° NOUS AVONS MONTRE LE ROLE ACTIVATEUR DE L'ARGININE DANS LA

DECARBOXYLATION DE L'ACIDE MALIQUE.

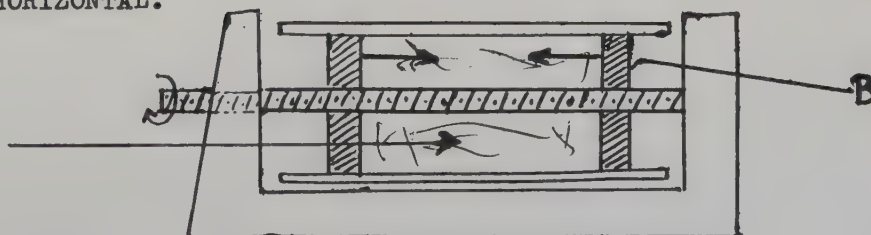
- 3° APRES AVOIR APPLIQUE NOTRE TECHNIQUE SUR UN MOUT ENRICHI EN ARGININE, NOUS AVONS DETRUIT L'EFFET STIMULANT DE CET AMINOACIDE. CE QUI VIENT CONFIRMER LE 1°, SOIT: QUE NOTRE TECHNIQUE CARENCE LE MOUT ET PAR SUITE LE VIN EN CET ELEMENT.
 - 4° APRES DIFFERENTS TRAVAUX, NOUS N'AVONS PAS; A L'INVERSE DE CERTAINS AUTEURS; CLASSE L'ARGININE COMME UN ELEMENT TOUJOURS CONSOMME PAR LA LEVURE. AU LIEU DE RANGER CET AMINOACIDE COMME ACTIVATEUR DE LEVURES, NOUS LUI AVONS TROUVE DES PROPRIETES OPPOSEES.
 - 5° DANS LES ETUDES DE PRESSURAGE DE LA VENDANGE, NOUS AVONS OBSERVE UN FORT ENRICHISSEMENT EN ARGININE ET ALANINE DANS LES JUS DE FIN DE SERRAGE ET UNE PREDISPOSITION DE CES DERNIERS A LA FERMENTATION MALOLACTIQUE. CE QUI APPORTE UNE CONFIRMATION AU 2°.
-

G L O S S A I R E .

ACESCENCE.	Altération microbiologique d'un vin, avec production d'acide acétique. synonyme: piqûre.
AMERTUME	Altération microbiologique d'un vin avec attaque du glycérol.
BOUQUET	Terme de dégustation, comprenant le fruit et les autres parfums du vin.
CASSE FERRIQUE.	Transformation du fer ferreux (soluble) en fer ferrique colloïdal. Cette réaction qui nécessite une légère oxydation, apporte au vin un trouble.
ENTONNER	Action de mettre dans un tonneau. Ce terme est souvent employé pour décrire l'action qui consiste à verser le moût sortant du pressoir dans des fûts ou des cuves.
FLEUR	Altération du vin, provoquée par des levures myco-dermiques se développant à la surface du liquide.
FRUIT.	Terme utilisé en dégustation pour désigner le parfum du raisin dont le vin est issu.
JEREZATION	Technique d'élaboration du Jerez (Xérès)
JUS DE GOUTTE	Jus du raisin sortant librement de la baie avant action du pressoir.
MAIE	Plateforme en bois ou en béton où se trouve placé le pressoir et dans laquelle on recueille le jus provenant du pressoir.
MOÛT	Nom donné au jus de raisin dès sa sortie du pressoir.
O.I.V.	Office International de la Vigne et du Vin. 11 rue Roquépine. Paris.
PIQÛRE	voir acescence.
PRESSOIR A CAGE ET VIS CENTRALE.	



PRESSOIR HORIZONTAL.



REBECHAGE. Action de retourner la vendange dans le pressoir après une première ou deuxième action de celui-ci sur les raisins.

RETROGRADATION MALOLACTIQUE. Synonyme de fermentation malolactique.

B I B L I O G R A P H I E .

1

Index alphabétique

A.

AMERINE(M.A)(64).Food.Tech.Champaign.I950.4,I77-8I.Cité par FORNACHON
(J.C.M).Australian.Journ,appl.Sci.I957,8,I20-I29.

AMERINE(M.A),JOCLYN(M.A)(65).Table Wines:The Technology of their Pro-
duction in California.(Univ.of.California Press)
Cité par FORNACHON(J.C.M).Australian.Journ.appl,
Sci.I957,8,I20-I29.

AMTHOR(C)(33).Cité par VENTRE(J).Traité de vinification pratique et
rationnelle,I943,Coulet,Montpellier,2,I96.

ARCHINARD(P),BOUDOT(J).(53).La teneur en ammoniac des vins et sa varia-
tion au cours du vieillissement.Ann.Fals.Fraudes,
I955,48,I7-2I.

ARENA(A).(42).Altéraciones bacterianas de vino Argentinos.Revista de
la Facultad de Agronomia e Veterinaria,Buenos-
Aires,I936,T VIII,I55-3I8.Cité par RIBEREAU-GAYON
(J),Bull.Assoc.Chim.I938,55,650.

B.

BALARD(M).(9).C.R.Acad.Sci.I86I,53,I226. Cité par RIBEREAU-GAYON(J),
PEYNAUD(E).Traité d'oenologie,I96I,Ch Béranger,
Paris et Liège,2,4I3.

- BANHIDI(Z.G.).(I35).(Wenner-Gren Inst.Exper.Biol.Univ.Stockholm,Sweden).
Activation of the disulfide forms of thiamine and
its phosphates as growth factor for Lactobacillus.
(Activation des formes disulfure de la thiamine et
de leurs phosphates comme facteurs de croissance
pour Lactobacillus fermenti).J.of.Bact.I960,79,I8I,
Cité par LAMBION(R).Rev.Ferm.Ind.alim.I96I,I6,25.
- BANHIDI(Z.G.).(I36).(Wenner-Gren Inst Exp.Biol.,Univ.Stockholm.Sweden).
Growth promotion of some heterofermentative Lacto-
bacilli with different derivatives of thiamine.(Acti-
vation de la croissance de quelques Lactobacilli
hétérofermentatifs avec différents dérivés de la
thiamine).Arkiv f  r Kemi.I960,I5,229.Cité par LAM-
BION(R).Rev.Ferm.Ind.alim.I96I,I6,25.
- BARAGIOLA(W.J),GODET(Ch).(59 bis).Die Verg  rung des Traubenmostes unter
Parrafin  l Ztschr.für G  rungsphysiologie.I9I4,IV,8I.
Cité par LUTHI(H).Rev.Ferm.Ind.alim.I957,I2,I8.
- BARRE(P),GALZY(P).(98).Etude d'une nouvelle bacterie malolactique. Ann.
Technol.agric.I960,2,33I-343.
- BARRE(P),GALZY(P).(I00).Etude d'un lactobacille homofermentatif isolé
d'un vin. Ann.Techol.agric.I962,II,I2I-I30.
- BENARD(P),JOURET(C).(I27).Essais de vinification.Comparaison entre trois
techniques de vinification en rouge(suite).Vignes
et Vins.I962,I09,7-11.
- BENVEGNIN(L).(79 bis).Cité par FERRE(L).Traité d'oénologie bourguignonne
I958,ext des Bull.inst.nat.Appel.Origine.Vins.Eaux
de vie.n   57,58,59,60,6I.
- BENVEGNIN(L),CAPT(E),PIGUET(G).(94).Traité de vinification,I95I,Payot
Lausanne.La maison rustique,Paris.
- BERGERET(J).(79).Observations sur la fermentation malolactique des vins
de Bourgagne récoltés en I957.C.R.Acad.Agric,I958,
44,673-677.
- BERTHELOT(M),de FLEURIEU(A).(I0).C.R.Acad.Sci.I864,58,720.Cité par RIBE-
REAU-GAYON(J),PEYNAUD(E),Traité d'oénologie,I96I,Ch
Béranger,Paris et Liège,2,4I2.

- BEZZEGH(Th). (I55). L'importance des bacteries lactiques en oenologie.
Weinberg und Keller, I963, n°10. Cité par Bull. Off, int
Vigne. Vin. I963, 36, I459.
- BEZZEGH(Th). (I57). (Zürich). Die bedeutung von Milchsäure-bakterien in der
Oenologie. (La signification des bacteries lactiques
en oenologie). Weinb. und Keller. I963, 10, 470. Cité par
LAMBION(R). Rev. Ferm. Ind. alim. I964, I9, I04.
- BIDAN(P). (54). Sur quelques bacteries isolées de vins en fermentation
malolactique. Ann. Technol. agric. I956, 4, 597-617.
- BIDAN(P). (84). Les germes de la fermentation malolactique. Colloque Oenolo-
gique de Mâcon. Vignes et Vins, I959, 80, 33-38.
- BIZEAU(C). (222). Etude des facteurs limitant la croissance des levures
dans le moût de "clairette" et de "muscat blanc
à petits grains". Ann. Technol. agric. I963, I2, 247-276.
- BLOCK, BOLLING. (141). Cités par RIBEREAU-GAYON(J), PEYNAUD(E), Traité d'
oenologie, I96I, Ch Béranger. Paris et Liège, 1, 205.
- BOUFFARD. (I6I). Intervention au Colloque Oenologique de Mâcon. Vignes et
Vins. I959, 80, 33.
- BOULANGER(P), BISERTE(G). La chromatographie de partage. Exposés annuels
de biochimie médicale. I950, Masson et Cie. Paris, 53-
2I.
- BOULARD. (I77). Sur un procédé permettant d'arrêter à volonté les fermen-
tations à n'importe quel moment. C.R. Acad. Agric. I926,
I2, 6I5-620.
- BOUSSINGAULT. (I5). publ. I868. Citée par RIBEREAU-GAYON(J), PEYNAUD(E). Trai-
té d'oenologie, I96I, Ch Béranger? Paris et Liège, 2,
4I2.
- BREED(R.S), PEDERSON(C.S). (99). The organisms causing rusty spot in ched-
dar cheese. Journ. of Bact. I938, 36, 667. Cité par
BARRE(P), GALZY(P). Ann. Technol. agric. I960, 2, 33I-343.
- BREED(R.S), MURRAY(E.G.D), SMITH(N.R). (IO3). Bergey's manual of determina-
tive bacteriology. Williams and Wilkins Co. 7 ème ed.
I957., Baltimore. Cité par RIBEREAU-GAYON(J), PEY-
NAUD(E). Traité d'oenologie, I96I, Ch Béranger, Paris
et Liège, 2, 465-466.

- BRUGIRARD(A), ROQUES, DIXONNE. (185). L'acide malique du raisin et du vin.
Bull. Technique de chambre d'Agriculture et Sté de
recherches et d'expérimentation agricoles des Pyre-
nées Orientales. 1965, 34, 14-27.
- BULLETIN D'INFORMATION DU MINISTERE DE L'AGRICULTURE. (93). La flore malo-
lactique des vins. Bull. Inf. n° 127, 2 Fev 1963.
- BULLETIN D'INFORMATION DU MINISTERE DE L'AGRICULTURE. (130). Actions bac-
tériennes dans les vins. Cité par La Journée Vinico-
le. 1965, 39, n° 11430, 3 Juin.

C.

- CARBALLO CAABEIRO(J). (181). Les antibiotiques en oenologie. Agricultura.
Madrid. Cité par Bull. Off. Int. Vigne. Vin. 1953, 26,
109-110.
- CARLES(J), LAMAZOU-BETBEDER(M). (22). Principales différences des acides
organiques et des acides aminés libres entre le
jus de raisin et le vin. C.R. Acad. Sci. 1958, 247,
2181-2184.
- CARLES(J), LAMAZOU-BETBEDER(M), PECH(R). (78). Existe-t-il une fermentation
citramalique dans le vin. C.R. Acad. Sci. 1958, 246,
2160-2162.
- CARLES(J), LAMAZOU-BETBEDER(M), PECH(R). (142). Etat actuel de nos connais-
sances sur quelques actions bactériennes dans les
vins. Ann. Technol. agric. 1961, 10, 61-71.
- CARLES(J), LAMAZOU-BETBEDER(M), PECH(R). (210). Les acides aminés libres
du vin. C.R. Acad. Sci. 1958. 24 Fev. 1254-1257.
- CARR(J.G). (51). Journ, Inst, Brew, 1957, 63, 436. et Ann, Reports, agric, Hort,
Research, Long, Ahston, 1952 p 144. Cité par RIBEREAU-
GAYON(J), PEYNAUD(E). Traité d'oenologie. 1961, Ch
Béranger. Paris et Liège. 2, 472.

- CARR(J.G).(66).(Research Station Long Ashton,Bristol).Occurence and activity of some lactic acid bacteria from apple juices, ciders and perries.(Présence et activité de quelques bacteries lactiques de jus de pommes, de poires et de cidres).J.Ins.Brew.1957,63,436.Cité par LAMBION(R).Rev.Ferm.Ind.alim.1958,13,83.
- CARR(J.G).(75).(Research Station,Long Ashton,Bristol England).The vitamin requirements of lactic acid bacteria from ciders.(Besoin en vitamines des bacteries lactiques des cidres).Ant.van.Leeuw.1958.24,63.Cité par LAMBION(R).Rev.Ferm.Ind.alim.1958,13,265.
- CASSIGNARD(R).(125).Sélection des levures en vue de l'ensemencement des jus de raisin.Vignes et Vins.1964,133,33-37.
- CHALLINOR(S.W),BURROUGHS(L.F).(57).The role of nitrogen in fermentation. Changes in the nitrogen Content of apple juice during fermentation.Ann.Rept.Long.Ashton.1948,182. Cité par LUTHI(H).Rev.Ferm.Ind.alim.1957,12,9.
- CHARPENTIE(Y).(52).Contribution à l'étude biochimique des facteurs de l'acidité des vins.Thèse.Ing.Doct.1954.Bordeaux.
- CHAUVET(J),BRECHOT(P),DUPUY(P),CROSON(M),IRRMANN(R).(121).Evolution des acides malique et lactique dans la vinification par macération carbonique de la vendange.Ann.Technol. agric.1963,12,237-246.
- CHEFTEL(R.I),MUNIER(R),MACHEBOEUF.(196).Bull.Soc.Chim.biol.1951,33,n°7.
- CONVENTION INTERNATIONALE POUR L'UNIFICATION DES METHODES D'ANALYSES ET D'APPRECIATION DES VINS.(199).Off.int.Vigne.Vin.11 rue Roquépine.Paris. 1962 et mises à jour.
- COOK(S),KREKE(W),GIERSCH(C),SCHROEDER(P).(123).A growth-depressant substance from yeast.Science,1941,93,616-617.
- CORDONNIER(R).(86).Vignes et Vins.1959,80.
- CORDONNIER(R).(145). La fermentation malolactique des vins.Prog.agric et vitic.1961,78,118-122.
- CORDONNIER(R).(207).Rapport Français à l'Off.int.Vigne.Vin. sur l'étude des protéines et des substances azotées.Bull.Off. int.Vigne.Vin.1966,39,1475-1489.

D.

DITTRICH(H).(I60).Essais de décomposition de l'acide malique avec une levure de la famille des Schizosaccharomyces.Die Wissens,1963,n°8.Cité par Bull.Off.int.Vigne.Vin. 1963,36,I230.

DOMERCQ(S),SUDRAUD(P),CASSIGNARD(R).(88).Sur la possibilité d'obtenir rapidement la fermentation malolactique des vins. 84 ème Congrès des Sociétés Savantes.Dijon.1959. Ed Gauthier-Villars.Paris.239-245.

DU PLESSIS(L.W).(I39). The microbiology of south african wine-marking. Pert V.Vitamin and aminoacid requirements of lactic acid bacteria from dry wines.(Microbiologie de la vinification en Afrique du Sud.V ème partie: besoins des bactéries de l'acide lactique des vins secs en vitamines et aminoacides).S.Afric.Journ.Sci Afrique du Sud,1963,6,485-494.Cité par Bull.Off. int.Vigne.Vin.1964,37,532-533.

DUPUY(P).(85).Vignes et Vins.1959,80.

DUPUY(P),MELAMED(N).(89).La croissance de lactobacillus arabinosus dans le jus de raisin: influence du pH,de l'éthanol et d'un hydrolysate tryptique.84 ème Congrès des Sociétés Savantes.Dijon.1959. Ed.Gauthier-Villars. Paris.263-274.

F.

FEDUCHY MARINO(E).(II8).Rapport Espagnol à l'Office.int.Vigne.Vin. Sur les méthodes d'isolement,de culture et de classification des bacteries malolactiques.Bull.Off.int. Vigne.Vin.1964,37,I273-I287.

FELL(G).(I52).Etude sur la fermentation malolactique du vin et sur les possibilités de la provoquer par ensemencement. Annuaire agricole de la Suisse.196I,n°634.249-264.

- FELL(G).(I56).Rapport Suisse à l'Off.int.Vigne.Vin.Sur les méthodes d'
d'isolement,de culture et de classification des
bactéries malolactiques.Bull.Off.int.Vigne.Vin.
I964,37,II75,II80.
- FERENZY(S).(223).Etudes des protéines et des substances azotées. Plan
de travail à l'intention des rapporteurs nationaux.
Bull.Off.int.Vigne.Vin.I966,429,I3II-I336.
- FERNBACH.(I94).Recueil de conférences de Fernbach à l'Institut Pasteur.
I927-I928.aimablement communiqué par HUMEAU(G).
Thouarcé.Maine et Loire.
- FERRE(L).(7).Traité d'oenologie Bourguignonne.I958.extrait des Bull.
Inst.nat.Appel.Origine.Vins.Eaux de vie.n°57,58,
59,60,61.
- FERRE(L).(40).Ann.Sci.agron.I922,277; Ann.Falsif.Fraudes.I926,21,75 et
I928,23,530.Cité par RIBEREAU-GAYON(J),PEYNAUD(E)
Traité d'oenologie.I96I,Ch Béranger.Paris et Liège,
2,4IO.
- FERRE,MICHEL.(204).Ann.Falsif.Fraudes.I933,p 25.Cité par JAULMES(P).
Analyses des vins.Poulain.Montpellier,I95I.
- FLANZY(M),CAUSERET(J),HUGOT(D),GUERILLOT(J).(I86).Contribution à l'étu-
de des boissons alcooliques.II.Etude comparée de
différents vins et de diverses techniques oenolo-
giques.Ann.Technol.agric.I955,4,359-380.
- FLEMING.(I44). Cité par PEYNAUD(E),DOMERCQ(S).Ann.Technol.agric.I96I,
10,58.
- FLESCH(P),JERCHER(D).(74).(Organisch-chemischen Institut der Universi-
tät Mainz).Neue Untersuchungen zum Abbau der L-
Apfelsäure durch Bacterium gracile.(Nouvelles re-
cherches sur l'utilisation de l'acide malique par
B.gracile).Mitt,Rebe u Wein,I958,série A,8.Cité
par LAMBION(R).Rev.Ferm.Ind.alim.I958,13,270.

- FLESCH(P), JERCHEL(D). (I24). (Organisch-chemischen Institut der Universität Mainz). Über die Züchtung von *Bacterium gracile* in natürlichen L. Apfelsäure enthaltenden Nährmedien. (Sur la culture de *Bacterium gracile* dans les milieux naturels contenant de l'acide L. malique). Mitteilungen. Série A. I960, I0. Cité par LAMBION(R). Rev. Ferm. Ind. alim. I96I, I6, 63.
- FLESCH(P), JERCHEL(D). (I5I). (Org. Chem. Inst., Univ. Mainz). Die Gefrierrocknung von *Bacterium gracile*. (La lyophilisation de *Bacterium gracile*). Mitt. Serie. A. Rebe u. Wein. I96I, 11, 12. Cité par LAMBION(R). Rev. Ferm. Ind. alim. I96I, I6, 211.
- FLESCH(P). (I53). Réalisation de la fermentation malolactique dans le vin avec des bacteries *gracile* "immobile". Mitt. XI, A/4. I96I. Cité par Bull. Off. int. Vigne. Vin. I96I. 34, 93.
- FLESCH(P). (I54). (Organisch-chemischen Institut der Universität Mainz). Die Durchführung des Biologischen Säureabbaues in Wein mit "ruhenden" *Gracile*-Bakterien. (La réalisation de la fermentation malolactique dans le vin à l'aide de bacteries *Gracile* non proliférantes). Mitt. Serie A. Rebe u. Wein. I96I, 11, I73. Cité par LAMBION(R), Rev. Ferm. Ind. alim. I962, I7, 26
- FLORENZO(G), VERONA(O). (II3). Rapport Italien à l'Off. int. Vigne. Vin. Sur les méthodes d'isolement, de culture et de classification des bacteries malolactiques. Bull. Off. int. Vigne. Vin. Commission II. I5 au I7 Juillet I963.
- FORNACHON(J.C.M). (63). The occurrence of malolactic fermentation in australian wines. L'existence de la fermentation malolactique dans les vins Australiens. Australian Journ. appl. Sci. I957, 8, I20-I29.
- FORNACHON(J.C.M). (II5). Travaux récents sur la fermentation malolactique. Symposium Int. Oenologie. Bordeaux. Ann. Technol. agric. I963, I2, n° hors série I.

FRESENIUS (W), GRUNHUT (L). (202). Zeits für analytische chemie. I92I, 60, 406.
Cité par RIBEREAU-GAYON (J), PEYNAUD (E). Analyse et
contrôle des vins. I958, Ch Béranger? Paris et Liège.

G.

CANDELOT. (6). Histoire de la ville de Beaune et de ses Antiquités. I772
Cité par FERRE (L). Traité d'oénologie Bourguignonne
I958, p I65. Ext des Bull. Inst. nat. Appel. Origine.
Vins. Eaux de vie, n   57, 58, 59, 60, 61.

GAYON (U). (I9). Rev. Vitic., I897, 7, 46I. Cité par RIBEREAU-GAYON (J), PEY-
NAUD (E). Traité d'oénologie, I96I, Ch Béranger, Paris
et Liège. 2, 409.

GAYON (U). (20). Rapport sur la vinification dans les années chaudes,
I895, Crugy-Riffaud, Paris. Rev. de Vitic. I896, 5, I5.
La vinification dans les pays chauds, Congrès de
Carthage, I896, Rev de vitic, I897, 7, 729. Progrès de
la vinification, Congr. int. de Vitic. I900. Principes
de vinification, I904, Feret, Bordeaux. Preparation
et conservation des vins, I905, Pech, Bordeaux. Cités
par RIBEREAU-GAYON (J), PEYNAUD (E), Traité d'O  nolo-
gie, I96I, Ch Béranger. Paris et Liège, 1, 484.

GENDRON (C). (I93). Influence du pressurage sur le taux d'azote organique
dans les moûts. Rev. Ferm. Ind. alim. I965, 20, 20I-205.

GENDRON (C). (I93 bis). Le pressurage des raisins à la vendange. Etude
biochimique et observations des répercussions sur
la fermentation alcoolique. Revue Française d'
O  nologie. (sous presse).

GRAY (P). (I84). Some Advances in Microbiological Control for Beer
Quality. Quelques progrès dans le contrôle micro-
biologique de la bière. Wallerstein. Labor. Comm.
I962, August. I66-I79.

H.

HARRIS(J.O),WATSON(W).(I26).(The Newcastle Breweries Ltd.Newcastle-upon Tyne).Observations on some beer spoilage Lactobacilli.(Observations sur quelques Lactobacillus d'infection de la bière).J.Inst.Brew.I960,66.I5I.Cité par LAMBION(R).Rev.Ferm.Ind.alim.I960,I5,67.

HOCHTRASSER(R).(II2).Ueber einige Bedinungen beim Lindwerden der Weine. Zürich.I955?Cité par MILISAVLJEVIC(D).Bull.Off.int.Vigne.Vin.I964,37,383.

HUSFELD(D.B).(3). Méthodes d'isolement,de culture et de classification des bacteries malolactiques.Rapport général à l'Off.int.Vigne.Vin.Bull.Off.int.Vigne.Vin.I964,395,397,398,40I,402,403,404,405,406.,I965,407.

HUSFELD(B).(9I). Rapport Allemand à l'Off.int.Vigne.Vin.Sur les méthodes d'isolement,de culture et de classification des bacteries malolactiques.Bull.Off.int.Vigne.Vin.I964,37,824-829.

I.

INGRAM(M).(I67).L'action antimicrobienne de l'anhydride sulfureux.Rev. Ferm.Ind.alim,I958,I3,I79-I88.

J.

JAULMES(P).(I98).Analyses des vins.Poulain.Montpellier.I95I.

JENSEN(H).(I74).Recherches sur le pouvoir bactericide des vins rouges. Thèse.Doct.mention pharmacie.Bordeaux.I954.Impr. Drouillard.Bordeaux.

JERCHEL(D), FLESCH(P), BAUER(E). (55). (Organisch-chemischen Institut der Universität Mainz). Untersuchungen zum abbau der L-Apfelsäure durch Bacterium gracile. (Recherches sur la dégradation de l'acide L-malique par Bacterium gracile). Just. Liebigs. Ann. der Chem. 601, 40, 193. Cité par LAMBION(R). Rev. Ferm. Ind. alim. 1957, 12, 149.

K.

KADAR(G). (165). La régulation de l'acidité comme moyen d'obtenir des vins de qualité. Publ. Acad. Horti. Viticult., 1964, n°2, 284-293. Cité par Ind. agric. alim. 1965, 82, 236.

KAISER(E). (24). L'acide lactique dans les vins, 1903, Paris. Cité par VENTRE(J). Traité de vinification pratique et rationnelle. 1943. Coulet. Montpellier. 2, 198-199.

KOCH(A). (25). XIX Deutscher Weinbau-Kongress, 1900. Cité par VENTRE(J), Traité de vinification pratique et rationnelle. 1943, Coulet. Montpellier. 2, 198-199. et par RIBE-REAU-GAYON(J), PEYNAUD(E). Traité d'oenologie, 1961, Ch Béranger. Paris et Liège. 2, 412.

KOCH(R). (122). Action antibiotique des levures à l'égard des bacteries. Brasserie et malterie de Belgique. 1953, 3, 250-253.

KONDO(G.E), FADENKO(P.S). (143). Rôle des bacteries malolactiques pendant l'élaboration du "Jerez". Vinod. vinograd. U.R.S.S. 1964, 2, 26-29. Cité par Bull. Off. int. Vigne. Vin. 1964, 37, 658.

KORKES(S), de CAMILLO(A), OCHOA(S). (59). Biosynthesis of dicarboxylic acid by carbon dioxide fixation. IV. Isolation und properties of an adaptive "malic" enzyme from Lactobacillus arabinosus. Journ. Biol. Chem., 1950, 187, 891. Cité par LUTHI(H). Rev. Ferm. Ind. alim. 1957, 12, 17.

- KRASSILNOKOV(N).(109). Diagnostique des bacteries et actinomycètes.
1949,Moscou.Cité par MILISAVLJEVIC(D).Bull.Off.
int.Vigne.Vin.1964,37,381.
- KULISCH(B).(16).Weinbau und Weinhandel,1899,Cité par RIBEREAU-GAYON(J),
PEYNAUD(E).Traité d'oenologie,1961,Ch Béranger,
Paris et Liège.2,412. et par VENTRE(J).Traité de
vinification pratique et rationnelle,1943,Coulet,
Montpellier.2,194.
- KUNKE RALPH(E),OUGH(C.S),AMERINE(M.A).(158). Introduction of malolactic
fermentation by inoculation of must and wine with
bacteria.(Intraduction de la fermentation malolac-
tique par unoculation du moût et du vin avec des
bacteries).American Journal of Enology and Viti-
culture,Etats-Unis?1964,4,178-183.Cité par Bull.
Off.int.Vigne.Vin.1965,38,421.
- L.
- LABORDE(J).(31).Congrès de Vienne,1907.Cité par RIBEREAU-GAYON(J),
PEYNAUD(E).Traite d'oenologie,1961,Ch Béranger.
Paris et Liège;2,412.
- LABORDE(J).(38).C.R.Acad.Sci.1917,165,793 et 1017.,P.V.Soc.Sci.phys.
Bordeaux 1917.Cité par RIBEREAU-GAYON(J).PEY-
NAUD(E).Traite d'oenologie.1961,Ch Béranger.Paris
et Liège.2,410.
- LABORDE(J).(133).Cité par RIBEREAU-GAYON(J).Progrès agricole et viti-
cole.1939,56,n°5.
- LAFON(J).(140).Cité par PEYNAUD(E),DOMERCQ(S),Ann.Technol.agric.1961
10,43-60.
- LAFON(J).(163).Remarques sur les vins blancs des Charentes destinés
à la production du Cognac.Communication aux Assi-
ses Triennales de l'Union Nationale des Oenologues
Nantes. Bull.Union.nat.Oenologues.n°20,42-44,1965.

LAFON-LAFOURCADE(S), PEYNAUD(E). (209). Composition azotée des vins en fonction des conditions de vinification. Ann. Technol. agric. I96I, IO, I43-I60.

LAFOURCADE(S). (I82). Contribution à l'étude des activateurs et des inhibiteurs de la fermentation alcoolique des moûts de raisin. Ann. Technol. agric. I954, 3, 283-332 et Ann. Technol. agric. I955, 4, 5-66.

LAFOURCADE(S), PEYNAUD(E). (I89). Sur la teneur des vins en riboflavine. Rev. Ferm. Ind. alim. I957, I2, 9-I4.

LAMBION(R), MESKHI(A). (60). Les bactéries de la fermentation malolactique. Rev. Ferm. Ind. alim. I957, I2, I3I-I44.

LEEUEWENHOECH van(A). (5). Cité par REIFF(F), KAUTZMANN(R), LUERS(H), LINDEMANN(M) Die Hefen in der Wissenschaft. I960, Verlag. Hans. Carl. Nurnberg p.5. et par RIBEREAU-GAYON(J) PEYNAUD(E). Traité d'oenologie, I96I, Ch Béranger. Paris et Liège. 2, 465.

LEMOIGNE(M). (50). Les ferments lactiques. Rev. Ferm. Ind. alim. I950, 5, 3-I4.

LUTHI(H). (56). La rétrogradation malolactique dans les vins et les cidres. Rev. Ferm. Ind. alim. I957, I2, I5-2I.

LUTHI(H), VETCH(U). (80). (Eidg. Versuchsanstalt Wädenswil) Beiträge zur Kenntnis des biologischen Säureabbaues in unvergorenen Obst- und Traubensäften. (Contribution à la connaissance de la rétrogradation malolactique des jus de fruits et de raisins fermentés ou non). Schweiz. Zeits. für Obst- und Weinbau, I959, 68, n°6. Trav. Chim. alim. hyg. I959, 50, 264. Cité par LAMBION(R) Rev. Ferm. Ind. alim. I960. I5. 32.

M.

- MALVEZIN(Ph). (I78). Sur la possibilité de préserver les vins des fermentations secondaires au moyen de "vaccins" préparés à l'aide de cultures de *saccharomyces ellipsoïdeus* et sur quelques cas de non efficacité apparente de cette méthode. Bull. Soc. chim. I927, 41, 42. 713-717.
- MANCEAU. (29). Cité par VENTRE(J). Traité de vinification pratique et rationnelle. I943, Coulet, Montpellier. 2, I96.
- MARECA-CORTES(I). (206). Sur les phénomènes rédox oenologiques. Ind. agric. alim. I962, 79, 829-838.
- MAR MONUX(D). (I38). Organismos destructores de acidos en el vino. (Organismes destructeurs des acides dans le vin). Sem. viti. vini. Esp. I963, 904, 4047-4051. Cité par Bull. Off. int. Vigne. Vin. I964, 37, 79.
- MARQUES GOMES(J.V), DA SILVA BABO(M.F), GUIMARES(A.F). (61). Estudos, Notes et relatorios. n°4. Comissão de Viticultura da Região dos Vinhos Verdes. I953, I7 Cité par LAMBION(R) MESKHI(A). Rev. Ferm. Ind. alim. I957, I2, I31-I44.
- MASQUELIER(J), POINT(G). (212). Le leucoanthocyane des cépages blancs de *vitis vinifera*. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux. I956, 95. 6-11.
- MAYER(K). (I49). Rapport Suisse à l'Off. Int. Vigne. Vin. Sur l'emploi des antiseptiques dans les vins en association avec l'anhydride sulfureux. Bull. Off. int. Vigne. Vin. I965, 38, 525-526.
- MELAMED(N). (I28). Détermination des sucres résiduels des vins, leur relation avec la fermentation malolactique. Ann. Technol. agric. I962, 11. 5-32. et Ann. technol agric I962, 11, I07-II9.

- MESTREZAT(W). (30). C.R. Acad. Sci., 1907, 145, 260. Ann. Chim. anal. 1907, 17, 173 et 347. Rev. Vitic. 1908, 29, 649. Cité par RIBERAU-GAYON(J), PEYNAUD(E). Traité d'oenologie, 1961, Ch Béranger. Paris et Liège 2, 412.
- MICHEL(M). (82). Etat actuel de nos connaissances sur la fermentation malolactique en Bourgogne. Colloque Oenologique de Mâcon. Vignes et Vins. 1959, 80, 18-21.
- MICHOD(J), FELL(G). (95). La fin de la fermentation malolactique, un moment critique de l'évolution du vin. Rev. Normande Agric. Vitic. Arboric. 1961, 17, 78-79. Lausanne
- MICHOD(J). (197). Méthode simple de recherche de l'acide malique dans les vins. Station fédérale d'essais agricoles de Lausanne.
- MILISAVLJEVIC(D). (76). Sur la fermentation malolactique dans les vins Ann. Sciences agronomiques de Belgrade, 1958, 11, 66-79.
- MILISAVLJEVIC(D). (108). Rapport Yougoslave à l'Off. int. Vigne. Vin. Sur les méthodes d'isolement, de culture et de classification des bactéries malolactiques. Bull. Off. int. Vigne. Vin. 1964, 37, 374-384.
- MILLIS(N.F), HUSAIN(I), MALL(A.N), WALKER(T.K). (1) . A mucilage-forming Lactobacillus species isolated from cider. Part I. Characteristics. (Une espèce de Lactobacillus isolée d'un cidre et formant du mucilage. I. caractéristiques). (Research Station, Long Ashton. Bristol). J. Appl. Bact. 1959, 21, 229. Cité par LAMBION(R). Rev. Ferm. Ind. alim. 1960, 15, 119.
- MOREAU(L). (27). Rev. Vitic. 1906, 26, 128 et 210. Cité par VENTRE(J). Traité de vinification pratique et rationnelle. 1943, Coulet. Montpellier, 2, 196. et par RIBERAU-GAYON(J) PEYNAUD(E). Traité d'oenologie, 1961, Ch Béranger, Paris et Liège, 2, 413.

- MOREAU(L), VINET(E). (28). Ann. Falsif. Fraudes. 1913, 6, 329. Cité par RIBEREAU-GAYON(J), PEYNAUD(E). Traité d'oenologie, 1961, Ch Béranger. Paris et Liège. 2, 413. et par VENTRE(J). Traité de vinification pratique et rationnelle, 1943, Coulet. Montpellier, 2, 196.
- MORGAN(A.F), NOBLES(H.L), WIENS(A), MARSH(G.L), WINKLER(A.J). (187). The B Vitamins of California Grape Juices and Wines. Food. Res. 1939, 4, 217. Cité par FLANZY(M), CAUSERET(J) HUGOT(D), GUERILLOT(J). Ann. Technol. agric 1955, 4, 359-380.
- MOSLINGER(D). (21). Zeits. Unters. Nahrungsmittel. 1901, 673 et 1121. Cité par RIBEREAU-GAYON(J), PEYNAUD(E). Traite d'oenologie, 1961, Ch Béranger? Paris et Liège. 2, 412.
- MULLER-THURGAU(H), OSTERWALDER(A). (34). Die Bakterien in Wein und Obst und die dadurch verursachten Veränderungen. Cent. Bakteriologie, II Abt, B, 36, 1912. et un ouvr. 210 p. Fischer 1913. cité par RIBEREAU-GAYON(J). Bull Assoc. Chim. 1938, 55, 601-655.
- MULLER-THURGAU(H), OSTERWALDER(A). (35). Weitere Beiträge zur Kenntnis der Mannitbakterien im Wein. Cent. Bakteriologie. (Nouvelle contribution à la connaissance des bacteries mannitiques du vin). Cent. Bakteriologie; II Abt. B. 48, I à 35, 1918. Cité par RIBEREAU-GAYON(J). Bull. Assoc. Chim. 1938, 55, 601-655.
- MULLER-THURGAU(H), OSTERWALDER(A). (36). Über die durch Bakterien verursachte Zersetzung von Weinsäure und Glycerin im Wein. (Sur la décomposition de l'acide tartrique et de la glycérine dans les vins, provoquée par des bacteries.). Landwirts. Jahrbuch der Schweiz. 1919, 49 pages. Cité par RIBEREAU-GAYON(J). Bull. Assoc. Chim. 1938, 55, 601-655.

N.

- NEGRE(E). (131). Contribution oenologique à l'étude des matières tannoïdes. C.R. Acad. Agric. 1939, 25, 647, 652.
- NEGRE(E). (132). Les matières tannoïdes et la composition des vins. Bull. Off. int. Vin. 1942, 15, 20-52. et Bull. Off. int. Vin. 1943, 16, 25-56.
- NEGRE(E). (159). La fermentation malolactique dans le Midi. Progrès agricole et viticole. 1962, 79, 59-63.
- NEGRE(E). (173). Contribution à l'étude des matières tannoïdes du vin. Thèse. Doct. es. Sci. Physiques. Montpellier. 1944. Impr des dernières nouvelles de Strasbourg. Strasbourg.
- NEGRE(E). (191). Les méthodes actuelles de vinification sont elles défavorables à la qualité du vin et par suite, à la santé des consommateurs. Extr du Progrès agricole et viticole. 1959, n° 17, 123 et suiv. Cité par Bull. C.E.T.A.V du Layon. 1959. n° 4. Sept.

O.

- OCHS(G). (96). Le bacterium gracile est la cause de la maladie de la paralysie des pétioles sur les vignes de rendement et de table. Mitt. série A, IX. 2 Nov. 1959. Cité par Bull. Off. int. Vigne. Vin. 1961, 34, 123.
- OFFICE INTERNATIONAL DE LA VIGNE ET DU VIN. (4). Compte-rendu de la première réunion de la Sous-commission " Microbiologie du vin ". Bull. Off. int. Vigne. Vin. 1964. 37, 814-823.
- OPARINE(A.I). (216). Biochimie du vin. Bull. Off. int. Vigne. Vin. 1963, 36, 1301-1310.

ORDONNEAU(C). (18). Bull. Soc. Chim. 1891(III), 6, 261. Cité par RIBEREAU-GAYON(J), PEYNAUD(E), Traité d'Oenologie, 1961, Ch Béranger, Paris et Liège, 2, 412. et par VENTRE(J) Traité de vinification pratique et rationnelle, 1943, Coulet. Montpellier, 2, 194.

P.

PASTEUR(L). (8). Un mémoire de Pasteur sur la fermentation lactique 1858
Cité par LEMOIGNE(M). Rev. Ferm. Ind. alim. 1950, 2,
3-14.

PASTEUR(L). (13). Etudes sur le vin. Ière éd. Paris 1866. 2ème éd. Paris 1873. et oeuvres de Pasteur, Masson, 1924. Cité par RIBEREAU-GAYON(J). Ann. Ferm. 1941, Masson, 6, 228.

PASTEUR(L). (14). Cité par RIBEREAU-GAYON(J). Traité d'oénologie, 1949, Ch Béranger, Paris et Liège. 80.

PERLMAN(L), MORGAN(A.F), (188). Stability of B Vitamins in Grape Juices and Wines. Food. Res. 1945, 10, 334. Cité par FLANZY(M) CAUSERET(J), HUGOT(D), GUERILLOT(J). Ann. Technol, agric, 1955, 4, 359-380.

PEYNAUD(E). (23). Contribution à l'étude biochimique de la maturation du raisin et de la composition des vins. Thèse . Ingénieur-Docteur. 1946. Bordeaux. Cité par RIBEREAU-GAYON(J), PEYNAUD(E), Traité d'oénologie. 1961, Ch Béranger. Paris et Liège. 1, 430.

PEYNAUD(E), DOMERCQ(S). (70). Présence démontrée de bactéries lactiques sur les raisins mûrs. C.R. Acad. Sci. 1961, 252. 3343-3344.

PEYNAUD(E), DOMERCQ(S). (87). Possibilité de provoquer la fermentation malolactique en vinification à l'aide de bactéries cultivées. C.R. Acad. Agric. France. 1959, 45 (15 Avril) 355.

PEYNAUD(E), DOMERCQ(S). (101). Etude sur les bactéries lactiques des vins Ann. Technol. agric. 1961, 10, 43-60.

- PEYNAUD(E), DOMERCQ(S), GUIMBERTEAU(G). (I06). Travail de classification des bacteries lactiques des vins. Intervention au Symposium Int.d'Oenol. Bordeaux. Ann. Technol. agric; I963, I2, n° hors serie I.
- PEYNAUD(E), DUPUY(P). (I20). Rapport Français à l'Off.int.Vigne.Vin. Sur les méthodes d'isolement, de culture et de classification des bacteries malolactiques. Bull. Off; int. Vigne.Vin. I964, 37, 908-922.
- PEYNAUD(E). (I37). Cité par RIBEREAU-GAYON(J), PEYNAUD(E). Traité d'oenologie. I96I, Ch Béranger. Paris et Liège. 2, 495.
- PEYNAUD(E). (I62). Les fermentations d'achèvement. Bulletin technique d'information du Ministère de l'Agriculture. I965, n°I96, 89-I06.
- PEYNAUD(E). (I90). Neue Gegebenheiten bezüglich des biologischen Säureabbaues. Mitteilungen Klosterneuburg. I955, 5, I83. Cité par LAFOURCADE(S), PEYNAUD(E). Rev. Ferm. Ind. alim, I957, I2, 9-I4.
- PEYNAUD(E), LAFON-LAFOURCADE(S), DOMERCQ(S). (I92). Besoins nutritionnels de soixante-quatre souches de bacteries lactiques isolées de vins. Bull. Off. int. Vigne. Vin. I965, 38, 945-958.
- PEYNAUD(E), LAFOURCADE(S). (2I8). Les équilibres vitaminiques chez les levures. Ann. Inst. Pasteur. I958, 94, 78-88.
- PEYNAUD(E), LAFON-LAFOURCADE(S). (220). Constitution azotée des levures en fonction des conditions de nutrition. Qual. Plant et Mat. Vegetables. I963, 2, 365. Cité par LAMBION(R) Rev. Ferm. Ind. alim. I964, I9, 6I.
- POUX(Ch), FLANZY(C), FLANZY(M). (225). Les levures alcooliques dans les vins, proteolyse et protéogénèse. Ann. Technol. agric. I964, I3, 5-I8. Ann. Technol. agric. I964, I3, 283-300. Ann. Technol. agric. I965, I4, 35-48.

PREVOT(A.R.).(104).Manuel de classification et de détermination des bacteries anaérobies.Masson.1957.Paris.Cité par RIBEREAU-GAYON(J),PEYNAUD(E).Traité d'oenologie 1961,Ch Béranger.Paris et Liège.2,465-466.

PRILLINGER(F).(213).(Klosterneuburg).Über die stickstoffhaltigen Substanzen im wein.(Sur les substances contenant de l'azote dans les vins).Mitt.Rebe u.Wein.Klost.1957 7,138.Cité par LAMBION(R).Rev.Ferm.Ind.alim.1958, 13,42.

R.

RADLER(F).(68).(Bundesforschungsanstalt für Rebenzuchtung Geilweilerhög) Untersuchungenüber die experimentelle Durchführung des biologischen Säureabbaues.(Recherches sur la réalisation expérimentale de la fermentation malolactique).Naturwissenschaften,1957,44,232.Cité par LAMBION(R).Rev.Ferm.Ind.alim.1958,13,87.

RADLER(F).(69).(Bundesforschungsanstalt für Rebenzuchtung Geilweilrhög, Siebeldingen über Landau,Pfalz).Untersuchung des biologischen Säureabbaus im Wein.Isolierung und Charakterisierung vom Apfelsäure-abbauenden Bakterien.(Recherches sur la rétrogradation malolactique des vins.Isolément et caractérisation des bacteries).Archiv.für Mikrob.1958,30,64.Cité par LAMBION(R).Rev.Ferm.Ind.alim.1958,13,264.

RADLER(F).(71).Mikrobiologische Untersuchung des bakteriellen Säureabbaus im Wein.(Etude microbiologique de la rétrogradation des vins).Naturwiss,1958,2,215.Cité par LAMBION(R).Rev.Ferm.Ind.alim.1958,13,264.

RADLER(F).(72).Untersuchung des biologischen Säureabbaus im Wein.III.

Die Energiequelle der Apfelsäure-abbauenden Bakterien.(Recherches sur la désacidification biologique des vins.III.Sources d'énergie des bacteries décomposant l'acide malique.Arch.für.Mikrob,I958, 31,224.Cité par LAMBION(R).Rev.Ferm.Ind.alim.I958 13,264.

RADLER(F).(73).Untersuchung des biologischen Säureabbaus im Wein.IV.

Über Faktoren,die das Wachstum des Apfelsäure-abbauenden Bakterien beeinflussen.(Recherches sur la désacidification biologique du vin.IV.Facteurs qui influencent la croissance des bacteries).Vitis I958,1,288. Cité par LAMBION(R),Rev.Ferm.Ind.alim; I958,13,264.

RADLER(F).(77).Archiv für Mikrobiologie,I958,30,64.Cité par Bull.Off. int.Vigne.Vin.I961,34,II3.

RADLER(F).(105).Sur les bacteries d'acide lactique du vin et la désacidification biologique.Vitis.Siebelingen.I962,n°3. Cité par Bull.Off.int.Vigne.Vin.I963,36,629.

RADLER(F).(114).(Forschungs-Institut für Rebenzüchtung Geilweilerhof).

Über die Milchsäurebakterien des Weines und den Biologischen Säureabbau.II.Physiologie et Ökologie der Bakterien.(Les bacteries lactiques du vin et la dégradation biologique.II.Physiologie et écologie des bacteries).Vitis,I963,3,207.Cité par LAMBION (R).Rev.Ferm.Ind.alim.I963,18,I37.

RADLER(F).(129).(Forschungsinstitut für Rebenzüchtung Geilweilerhof).

Über die Milchsäurebakterien des Weines und den biologischen Säuregehalt im Wein.(Les bacteries lactiques du vin et la dégradation malolactique. III.Méthodes de modification de l'acidité du vin). Vitis,I963,4,62. Cité par LAMBION(R).Rev.Ferm.Ind. alim.I964,19,I33.

RADLER(F).(147).La formation d'acétoïne et de diacétyl par les bacteries dans la désacidification biologique.Vitis. I962,n°3.Cité par.Bull.Off.int.Vigne.Vin.I963, 36,102.

RADLER(F). (148). (Forschungs-Inst.f.Rebenzüchtung, Geilweilerhof, Siebel-
dingen, Landau/Pfalz). Die Bildung von Aceton und
Diacetyl durch die Bakterien des biologischen
Säureabbaus. (La synthèse d'acétone et de diacéty-
le par les bactéries de la fermentation malolac-
tique). Vitis. 1963, 3, 136. Cité par LAMBION(R), Rev,
Ferm. Ind. alim. 1962, 17, 206.

REGULEX. (205). Notice 3.A.Labo-Centre. 195. Av de la Libération, Clermont-
Ferrand.

RIBEREAU-GAYON(J). (11). Ann. Ferm. 1941. Masson, 6, 228-233.

RIBEREAU-GAYON(J), PEYNAUD(E). (12). Traité d'oenologie. 1961. Ch Béranger.
Paris et Liège. 1 et 2.

RIBEREAU-GAYON(J). (37). Les bactéries du vin et les transformations
qu'elles produisent. Bull. Assoc. Chim. 1938, 55,
601-655.

RIBEREAU-GAYON(J), PEYNAUD(E). (41). La désacidification du vin par les
bactéries. C.R. Acad. Agric. 1938, 24, 600-605.

RIBEREAU-GAYON(J). (43). Les bactéries du vin. Procès verbaux de la Sté
des Sciences physiques de Bordeaux. 17 Juin 1937.

RIBEREAU-GAYON(J), PEYNAUD(E). (44). Bilan de la fermentation malolacti-
que. Ann. Ferm. 1938, 4, 559-569.

RIBEREAU-GAYON(J), (45). Les bactéries du vin et les transformations
qu'elles provoquent. Progrès agricole et viticole.
1939, 3, n°2.

RIBEREAU-GAYON(J). (46). Etudes sur les transformations du vin par les
bactéries. Ann. Ferm. 1942, 7, n°1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10.

RIBEREAU-GAYON(J). (102). Cité par PEYNAUD(E), DOMERCQ(S). Ann. Technol,
agric, 1961, 10, 47.

RIBEREAU-GAYON(J). (134). Traité d'oenologie. 1949, Ch Béranger. Paris et
Liège.

RIBEREAU-GAYON(J), MAURIE(A). (200). Bull. Off. int. Vin. 1942, 15, n°150.60.
Cité par RIBEREAU-GAYON(J), PEYNAUD(E). Analyse et
contrôle des vins. 1958, Ch Béranger. Paris et Liège.

- RIBEREAU-GAYON(J), PEYNAUD(E)*(201). Analyses et contrôle des vins.
1958, Ch Béranger. Paris et Liège.
- RIBEREAU-GAYON(J), PEYNAUD(E).(208). Acides aminés des moûts et alcools
supérieurs des vins. 84 ème Congrès des Sociétés
Savantes. Dijon. Gauthier-Villars. Paris, 1960, 247-
251.
- RIBEREAU-GAYON(J), MAURIE(A).(211). Les composés phénoliques du vin;
Bull. Off. int. Vin. 1942, 15, 60-76.
- RIBEREAU-GAYON(J), PEYNAUD(E), GUIMBERTEAU(G).(221). Formation des pro-
duits secondaires de la fermentation alcoolique
en fonction de l'alimentation azotée des levures.
C.R. Acad. Sci. 1959, 248, 749-751.
- RIPPEL(K).(48). Nouveaux résultats concernant la désacidification bac-
térienne dans le vin. Deutsche. Wein. Zeitung, 1942,
18 Dec. Cité par Bull, Off, int, Vigne, Vin. 1943, 16, 89.
- ROSENSTEIN(E).(164). Problèmes de vinification en pays chauds. Bull. Off.
int. Vigne. Vin. 1965, 38, 164-184.
- ROSENSTHIEL(A).(32). Rev. Vitic, 1908, 29, 509. Cité par RIBEREAU-GAYON(J),
PEYNAUD(E). Traité d'oenologie. 1961, Ch Béranger,
Paris et Liège.
- RUTTER(W.J), LARDY(H.A).(97). Purification and properties of pigeon liver
malic enzyme. J. Biol. Chem. 1958, 233, 374-382. Cité
par CARLES(J), LAMAZOU-BETBEDER(M), PECH(R). Ann.
Technol. agric. 1961, 10, 61-71.

S.

- SALLES(J.B;v), OCHOA(S).(58). Biosynthesis of dicarboxylic acids by car-
bon dioxide fixation. II. Further study of the pro-
perties of the "malic" enzyme of pigeon liver. Journ
Biol. Chem. 1950. 187, 949. Cité par LUTHI(H). Rev. Ferm.
Ind. alim. 1957, 12, 11.

- SCARDOVI(V). (I68). Ann.di.Microbiol.I95I,4,I3I.Cité par LAMBION(R),
Rev.Ferm.Ind.alim.I958,I3,I84.
- SCARDOVI(V). (I69). Ann.di.Microbiol.I952,5,5. Cité par LAMBION(R).Rev.
Ferm.Ind.alim.I958,I3,I84.
- SCARDOVI(V). (I70). Ann.di.Microbiol.I953,5,I40.Cité par LAMBION(R).Rev
Ferm.Ind.alim.I958,I3,I84.
- SCARDOVI(V). (I7I). Ann.di.Microbiol.I956,7,30,Cité par LAMBION(R).Rev.
Ferm.Ind.alim.I958,I3,I84.
- SCAZZOLA(E). (I72). Remarques sur les vinifications de I963. Midi Vini-
cole.I964.68,n°4II9.
- SCHAEFFER(Y). (2I7). Les ferments.Masson.Paris.I929.
- SCHANDERL(H). (47). Le bleuissement biologique des vins mousseux; Bull
Off.Int.Vin.I942,I5,43-50.
- SCHANDERL(H). (I66). Rapport Allemand à l'Off.int.Vigne,Vin.Sur les
phénomènes d'oxydo-réduction au cours de la matu-
ration et du vieillissement du vin et procédés
pour le modifier.Bull.Off.int.Vigne.Vin.I964,37,
490-497.
- SCHANDERL(H). (I76). Influence des polyphénols et des substances tan-
nantes sur la physiologie de la levure de vin et
la valeur du test à pH 7 pour la sélection des
mousseux de base.Mitt.Rebe u.Wein;I962,I2,265.
Cité par Bull.Off.int.Vigne,Vin.I963,36,373.
- SCHANDERL(H),STANDEMEYER(T), (203). Comment reconnaître la richesse
excessive en polyphénols des vins destinés à être
transformés en mousseux.Wein.Rebe.I96I,n°97.Cité
par Bull.Off;int.Vigne.Vin.I962,35,I697-I698.
- SCHERB. (I75) .Le pouvoir bactéricide du vin.Journée vinicole 28 Août
I953.Cité par Bull.Off.int.Vigne.Vin.I953,26,I24.

- SCHOPFER(W.H). (219). Plants and vitamins, Chronica Botanica Company, édit, Waltham. 1949. Les équilibres vitaminiques chez les microorganismes. VII. Congrès International de botanique. Stockholm. 1950. Données nouvelles relatives à la biosynthèse de quelques vitamines en relation avec l'équilibre vitaminique. VI. Congrès international de microbiologie. SCHOPFER(W.H), POSTERNAK(Th), HAENNI(H), Helv. Physiol. Acta 1954, 12, 30. Cité par PEYNAUD(E), LAFOURCADE(S) Ann. Inst. Pasteur. 1958, 94, 78-88.
- SCHWARTZ(J). (83). La fermentation malolactique dans les vins d'Alsace. Colloque Oenologique de Mâcon. Vignes et Vins; 1959, 80, 29-30.
- SEIFERT(W). (26). Zeits. Landw. Versuchs. Oesterreich, 1901, 980; 1903, 567. Cité par VENTRE(J). Traité de vinification pratique et rationnelle. 1943, Coulet. Montpellier, 2, 198-199 et par RIBEREAU-GAYON(J), PEYNAUD(E), Traité d'oenologie, 1961, Ch Béranger. Paris et Liège. 2, 412.
- SEIGNEURIN(R), CARRAZ(G), ROUX(A), SYNDICO(S). (179). De l'action bacterios-tatique in vitro des extraits de levure de bière et de bacteries du vinaigre. Ann. Institut Pasteur, 1947, 73, 81-82.
- SERVIERE(Ph). (2) Le médecin devant l'oenologie. Faut-il défendre l'acide malique. Vignes et vins. 1962, n° 113, 5-7.
- SERVIERE(Ph). (226). Valeur biologique de l'acide malique: nouvelle notion en biologie. Aliment et Vie, 50 n° 7, 8, 9. 191-195.
- SILVA BABO(M). (116). Essais d'application des bacteries malolactiques aux vins verts. Intervention au Symposium Int. d'Oenol. Bordeaux. Ann. Technol. agric, 1963, 12; n° hors série I.

STRANDSKOV (F.B), BOCKELMANN (J.B). (183). The Effect of Yeast Strain on Bacterial Growth in Brewery Fermentations. (L'influence de la variété de levure sur le développement bacterien dans les fermentations de brasserie.). Wallerstein. Labor. Com. 1958, 21, 49-58.

SUDRAUD (P), CASSIGNARD (R). (81). Travaux récents sur la fermentation malolactique en Bordelais. Colloque Oenologique de Mâcon. Vignes et Vins. 1959, 80, 10-13.

SUDRAUD (P). (227). Le fer dans les vins. Journal de France des Appellations d'Origine. 1965, 22, n° 248.

SYMPOSIUM INTERNATIONAL d'OENOLOGIE; (107). Bordeaux 10 au 15 Juin. Ann. Technol. agric, 1963, 12, n° hors serie I

T.

TERCELJ (D). (215). La diminution des composés azotés dans le vin par différents collages. Ann. Rechnol. agric, 1966, 15, 73-77.

TERCELJ (D). (214). Etude des composés azotés du vin. Ann. Technol. agric, 1965, 14, 307-319.

TESIC (Z). (110). Les systèmes récents de classification des bacteries. Ann. Facult. agr. Novi-Sad. 1958, 2. Cité par MILISAVLJEVIC (D). Bull. Off. int. Vigne. Vin. 1964, 37, 382.

TESIC (Z). (111). Clé simplifiée pour la détermination des genres chez les bacteries et les actinomycètes. Agrohemija. 1962, 10. Cité par MILISAVLJEVIC (D). Bull. Off. int. Vigne. Vin. 1964, 37, 383.

TZYB (T.S). (205 bis). Sur la fermentation malolactique dans le Jerez. Vinodelie i Vinogradarstvo. U.R.S.S. 1965, 2, 18-20. Cité par Bull. Off. int. Vigne. Vin. 1965, 38, 663.

V.

VAUGHN(R.H), DOUGLAS(H.C), FORNACHON(J.C.M).(49). Hilgardia, 1949, 19, 133.

Cité par RIBEREAU-CAYON(J), PEYNAUD(E), Traité d'oenologie, 1961, Ch Béranger, Paris et liège. 2, 472.

VAUGHN(R.H), TCHELISTCHEFF(A).(67). (University of California, Davis)

Studies on the malic fermentation of California table wines. (Etudes sur la fermentation malolactique des vins de table Californiens. I. Introduction au problème). Am. J. of Enology. 1957, 8, 74. Cité par LAMBION(R). Rev. Ferm. Ind. alim. 1958, 13, 126.

VENTRE(J).(17). Traité de vinification pratique et rationnelle. 1943

Coulet. Montpellier. 1, 2 et 3.

VIANA MARQUES GOMEZ(J), FERREIRA DA SILVA BABO(M).(119). Rapport Portu-

gais à l'Off. int. Vigne. Vin. Sur les méthodes d'isolement, de culture et de classification des bacteries malolactiques. Bull; Off. int. Vigne. Vin; 1965, 38, 54-68.

VILAR ROSA DA COSTA(A).(146). La fermentation malolactique et les vins

du Dao. Agricultura, 1961, n°11. Cité par Bull. Off; int. Vigne. Vin. 1962, 35, 417.

W.

WAKSMAN(A).(180). Antagonismes microbiens et substances antibiotiques.

1948, Sedes, Paris.

WEBB(R.B), INGRAHAM(J.L).(92). Amer. J. Enol. Vitic. 1960, 2, 59. Cité par

PEYNAUD(E), DOMERCQ(S). C. R. Acad. Sci. 1961, 252, 3343.

WEBB(R.B), INGRAHAM(J.L).(150). Les fermentations malolactiques provo-

quées. Amer. Journ. of Enol. and Vitic. Vol II. n°12. Cité par Bull. Off. int. Vigne. Vin. 1961, 34, 112.

WEISS(H), ROUSSET(A), MAILLARD(M.T), BONNET(R). (224). L'évolution qualitative et semi-quantitative des acides aminés au cours de la fermentation des moûts de raisin provenant de cépages d'Alsace. C.R. Acad. Sci. 1960, 15 Fev. I322-I324.

WOOLLEY(D.W). (90). Etude sur la découverte, la purification et les propriétés chimiques de la Straptogenine. Bull. Soc, Chim. biol. Supplément, 1948, n°11-12. I01-II3.

Index par ordre de citation

- (1) MILLIS(N.F),HUSAIN(I),HALL(A.N),WALKER(T.K).A mucilage-forming Lactobacillus species isolated from cider.Part.1.Characteristics. (Une espèce de Lactobacillus isolée d'un cidre et formant du mucilage.I.Characteristiques).(Research Station,Long Ashton,Bristol) J.Appl.Bact.I959,21,299,cité par LAMBION(R) Rev.Ferm.Ind.alim., I960,I5,119.
- (2) SERVIERE(P),Le médecin devant l'oénologie.Faut-il défendre l'acide malique.Vignes et vins,I962,n°113,5-7.
- (3) HUSFELD(D.B)Méthodes d'isolement,de culture et de classification des bactéries malolactiques.Rapport général à l'Office International de la Vigne et du Vin. Bull.Off.int.Vigne.Vin.I964 n°395, 397,398,401,402,403,404,405,406.I965,n°407.
- (4) OFFICE INTERNATIONAL DE LA VIGNE ET DU VIN. Compte rendu de la première réunion de la sous-commission "Microbiologie du vin". Bull.Off.int.Vigne.Vin.I964 n°401,402,814-823.
- (5) van LEEUWENHOECK(A) cité par REIFF(F),KAUTZMANN(R),LUERS(H), LINDEMANN(M) Die Hefen in der Wissenschaft.I960,Verlag.Hans. Carl.Nurnberg p 5 et par RIBEREAU-GAYON(J),PEYNAUD(E),Traité d' Oenologie.I961,Ch.Béranger,Paris et Liège,2,465
- (6) GANDELOT.Histoire de la Ville de Beaune et de ses Antiquités,I772, cité par FERRE(L),Traité d'Oenologie Bourguignonne,I958,extrait des Bull.Inst.nat.Appel.Origine.Vins.Eaux de vie,n° 57,58,59,60,61 p.165.
- (7) FERRE(L),Traité d'Oenologie Bourguignonne,I958,extrait des Bull. Inst.nat.Appel.Origine.Vins.Eaux de vie,n° 57,58,59,60,61.
- (8) PASTEUR(L)Un mémoire de PASTEUR sur la fermentation lactique I858 cité par LEMOIGNE(M)Les ferments lactiques.Rev.Ferm.Ind.alim ,5, I950. 3-I4.

- (9) BALARD(M) C.R.Acad.Sci.,1861,53,1226,cité par RIBEREAU-GAYON(J), PEYNAUD(E),Traité d'Oenologie,1961,Ch Béranger,Paris et Liège, 2,413.
- (10) BERTHELOT(M),de FLEURIEU(A).C.R.Acad.Sci.,1864,58,720. cité par RIBEREAU-GAYON(J),PEYNAUD(E),Traité d'Oenologie,1961,Ch Béranger Paris et Liège,2,412.
- (11) RIBEREAU-GAYON(J)Ann.Ferm.1941,Masson,6,228-233.
- (12) RIBEREAU-GAYON(J),PEYNAUD(E),Traité d'Oenologie,1961,Ch.Béranger Paris et Liège,1et 2.
- (13) PASTEUR(L).Etudes sur le vin,1ère éd.,Paris 1866; 2ème éd.,Paris 1873 et Oeuvres de PASTEUR,Masson,1924.cité par RIBEREAU-GAYON(J) Ann.Ferm.1941,Masson,6,228.
- (14) PASTEUR(L) Cité par RIBEREAU-GAYON(J)Traité d'Oenologie,1949, Ch.Béranger,Paris et Liège,80.
- (15) BOUSSINGAULT,1868,cité par RIBEREAU-GAYON(J),PEYNAUD(E),Traité d'Oenologie,1961,Ch.Béranger,Paris et Liège,2,412.
- (16) KULISCH(B),Weinbau und Weinhandel,1899,cité par RIBEREAU-GAYON(J) PEYNAUD(E),Traité d'Oenologie,1961,Ch.Béranger,Paris et Liège, 2,412.et par VENTRE(J) Traité de vinification pratique et rationnelle.1943,Coulet,Montpellier,2,194.
- (17) VENTRE(J) Traité de vinification pratique et rationnelle,1943, Coulet,Montpellier,1,2 et 3.
- (18) ORDONNEAU(C) Bull.Soc.Chim.,1891,(III),6,261.cité par RIBEREAU-GAYON(J),PEYNAUD(E),Traité d'Oenologie,1961,Ch.Béranger,Paris et Liège,2,412 et par VENTRE(J) Traité pratique de vinification pratique et rationnelle,1943,Coulet,Montpellier,2,194.
- (19) GAYON(U).Rev.Vitic.,1897,7,461.cité par RIBEREAU-GAYON(J), PEYNAUD(E),Traité d'Oenologie,1961,Ch.Béranger,Paris et Liège, 2,409.
- (20) GAYON(U).Rapport sur la vinification dans les années chaudes, 1895,Crugy-Riffaud,Paris. Rev.de Vit.1896,5,15.La vinification dans les pays chauds,Congrès de Carthage,1896, Rev de Vit,1897, 7,729.Progrès de la vinification,Congr.int.de Vit.,1900.Principes de vinification,1904,Feret,Bordeaux.Préparation et conservation des vins,1905,Pech,Bordeaux.Cité par RIBEREAU-GAYON(J),PEYNAUD(E),Traité d'Oenologie,1961,Ch.Béranger,Paris et Liège, 1,484.

- (21) MOSLINGER(D) Zeits.Unters.Nahrungsmittel,1901,673 et 1121.
Cité par RIBEREAU-GAYON(J),PEYNAUD(E),Traité d'Oenologie,1961,
Ch.Béranger,Paris et Liège,2,412.
- (22) CARLES(J),LAMAZOU-BETBEDER(M),Principales différences des
acides organiques et des acides aminés libres entre le jus
de raisin et le vin.C.R.Acad.Sci.,1958,247,2181-2184.
- (23) PEYNAUD(E) Contribution à l'étude biochimique de la maturation
du raisin et de la composition des vins.Thèse Ingénieur-Doc-
teur,1946,Bordeaux.cité par RIBEREAU-GAYON(J),PEYNAUD(E),Trai-
té d'Oenologie,1961,Ch.Béranger,Paris et Liège,1,430.
- (24) KAYSER(E).L'acide lactique dans les vins,1903,Paris.cité par
VENTRE(J).Traité de vinification pratique et rationnelle,1943,
Coulet,Montpellier,2,198-199.
- (25) KOCH(A) XIX Deutscher Weinbau-Kongress,1900.cité par VENTRE(J)
Traité de vinification pratique et rationnelle,1943,Coulet,
Montpellier,2,198-199 et par RIBEREAU-GAYON(J),PEYNAUD(E),Trai-
té d'Oenologie,1961,Ch.Béranger,Paris et Liège,2,412.
- (26) SEIFERT(W).Zeits.Landw.Versuchs.Oesterreich,1901,980;1903,567.
cité par VENTRE(J).Traité de vinification pratique et ration-
nelle,1943,Coulet,Montpellier,2,198-199 et par RIBEREAU-GAYON
(J),PEYNAUD(E),Traité d'Oenologie,1961,Ch.Béranger,Paris et
Liège,2,412.
- (27) MOREAU(L)Rev.Vitic.,1906,26,128 et 210.Cité par VENTRE(J).
Traité de vinification pratique et rationnelle,1943,Coulet,
Montpellier,2,196 et par RIBEREAU-GAYON(J),PEYNAUD(E),Traité
d'Oenologie,1961,Ch.Béranger,Paris et Liège,2,413.
- (28) MOREAU(L),VINET(E).Ann.Falsif.Fraudes,1913,6,329.Cité par
RIBEREAU-GAYON(J),PEYNAUD(E),Traité d'Oenologie,1961,Ch.Béran-
ger,Paris et Liège,2,413. et par VENTRE(J),Traité de vinifica-
tion pratique et rationnelle,1943,Coulet,Montpellier,2,196.
- (29) MANCEAU.cité par VENTRE(J),Traité de vinification pratique et
rationnelle,1943,Coulet,Montpellier,2,196.
- (30) MESTREZAT(W)C.R.Acad.Sci.,1907,145,260.Ann.Chim.anal.1907,17,
173 et 347.Rev.Vitic. 1908,29,649. cité par RIBEREAU-GAYON(J),
PEYNAUD(E),Traité d'Oenologie,1961,Ch.Béranger,Paris et Liège,
2,412.

- (31) LABORDE(J). Congrès de Vienne, 1907. cité par RIBEREAU-GAYON(J), PEYNAUD(E), Traité d'Oenologie, 1961, Ch. Béranger, Paris et Liège, 2, 410.
- (32) ROSENSTHIEL(A). Rev. Vitic., 1908, 29, 509, Cité par RIBEREAU-GAYON(J), PEYNAUD(E), Traité d'Oenologie, 1961, Ch. Béranger, Paris et Liège, 2, 412.
- (33) AMTHOR(C), cité par VENTRE(J), Traité de Vinification pratique et rationnelle, 1943, Coulet, Montpellier, 2, 196.
- (34) MULLER-THURGAU(H), OSTERWALDER(A), Die Bakterien im Wein und Obstwein und die dadurch verursachten Veränderungen. Cent. Baktériologie, II Abt, B, 36, 1912 et un ouvr., 210 p., Fischer 1913. cité par RIBEREAU-GAYON, Les bactéries du vin et les transformations qu'elles produisent, Bull, Assoc, Chim, 1938, 55, 601-655.
- (35) MULLER-THURGAU(H), OSTERWALDER(A), Weitere Beiträge zur Kenntnis der Mannitbakterien im Wein. Cent. Bakteriologie, Nouvelles contributions à la connaissance des bactéries mannitiques du vin, Cent Baktériologie, II Abt, B, 48, 1 à 35, 1918, cité par RIBEREAU-GAYON(J), Les bactéries du vin et les transformations qu'elles produisent Bull, Assoc, Chim, 1938, 55, 601-655.
- (36) MULLER-THURGAU(H), OSTERWALDER(A), Über die durch Bakterien verursachte Zersetzung von Weinsäure und Glycerin im Wein. Sur la décomposition de l'acide tartrique et de la glycérine dans les vins, provoquée par des bactéries. Landwirts. Jahrbuch der Schweiz 1919, 49 pages. cité par RIBEREAU-GAYON(J) Les bactéries du vin et les transformations qu'elles produisent. Bull, Assoc, Chim, 1938, 55, 601-655.
- (37) RIBEREAU-GAYON(J) Les bactéries du vin et les transformations qu'elles produisent, Bull, Assoc, Chim, 1938, 55, 601-655.
- (38) LABORDE(J) C.R. Acad, Sci, 1917, 165, 793 et 1017, . P.V. Soc, Sci. phys. Bordeaux 1917. Cité par RIBEREAU-GAYON(J), PEYNAUD(E), Traité d'oénologie, 1961, Ch Béranger, Paris et Liège, 2, 410.
- (40) FERRE(L) Ann. Sc. agron. 1922, 277, ; Ann. Falsif. Fraudes, 1926, 21, 75 et 1928, 23, 530. cité par RIBEREAU-GAYON(J), PEYNAUD(E), Traité d'oénologie, 1961, Ch Béranger, Paris et Liège, 2, 410.
- (41) RIBEREAU-GAYON(J), PEYNAUD(E), La désacidification des vins par les bactéries, C.R. Acad, Agr, 1938, 24, 600-605.

- (42) ARENA(A)Altéraciones bacterianas de vino Argentinos.Revista de la Facultad de Agronomia e Veterinaria,Buenos-Aires,T VIII, 1936,I55-3I8,cité par RIBEREAU-GAYON(J) les bactéries du vin et les transformations qu'elles produisent,Bull,Assoc,Chim, 1938,55,650
- (43) RIBEREAU-GAYON(J)Les bactéries du vin.Procès verbaux de la Sté des Sciences Physiques de Bordeaux,I7 juin 1937.
- (44) RIBEREAU-GAYON(J),PEYNAUD(E),Bilan de la fermentation malolactique,Ann,Ferm,1938,4,559-569.
- (45) RIBEREAU-GAYON(J),Les bactéries du vin et les transformations qu'elles provoquent,Progrès agricole et viticole,1939,3,n°2.
- (46) RIBEREAU-GAYON(J),Etudes sur les transformations du vin par les bactéries,Ann,Ferm,1942,7,n°1,2,3,4,5,6,7,8,9,10.
- (47) SCHANDERL(H)Le bleuissement biologique des vins mousseux,Bull Off,int,Vigne,Vin,1942,I5,43-50
- (48) RIPPEL(K)Nouveaux résultats concernant la désacidification bactérienne dans le vin.Deutsche,Wein,Zeitung,1942,I8 Dec. Cité par Bull,Off,int Vigne,Vin,1943,I6,89.
- (49) VAUGHN(R.H),DOUGLAS(H.C),FORNACHON(J.C.M).Hilgardia,1949,I9,I33 Cité par RIBEREAU-GAYON(J),PEYNAUD(E),Traité d'oenologie,196I, Ch Béranger,Paris et Liège.2.472.
- (50) LEMOIGNE(M),Les ferments lactiques,Rev,Ferm,Indus,alim,1950,5; 3-I4.
- (51) CARR(J.G)Journ ,Inst,Brew,1957,63,436. et Ann,Reports,agric, Hort,Research,Long Ahston,1952 p I44.Cité par RIBEREAU-GAYON(J) PEYNAUD(E),traité d'oenologie,196I,Ch Béranger,Paris et Liège, 2,472.
- (52) CHARPENTIE(Y),Contribution à l'étude biochimique des facteurs de l'acidité des vins.Thèse ing Doct,1954,Bordeaux.
- (53) ARCHINARD(P),BOUDOT(J),La teneur en ammoniac des vins et sa variation au cours du vieillissement,Ann,Fals,Fraudes,1955, 48,I7-2I.
- (54) BIDAN(P)Sur quelques bactéries isolées de vins en fermentation malolactique.Ann,Techn,agr,1956,4,597-6I7.

- (55) JERCHEL(D), FLESCH(P), BAUER(E), (Organisch-chemischen Institut der Universität Mainz). Untersuchungen zum abbau der l-Apfelsäure durch Bacterium gracile. (Recherches sur la dégradation de l'acide l-malique par Bacterium gracile). Just. Liebigs. Ann der Chem, 60I, 40(I93). cité par LAMBION(R), Rev. Ferm. Ind, alim, I957, I2, I49.
- (56) LUTHI(H), La retrogradation malolactique dans les vins et les cidres. Rev. Ferm. Ind. alim, I957, I2, I5-2I
- (57) CHALLINOR(S.W.), BURROUGHS(L.F) The role of notrogen in fermentation. Changes in the nitrogen Content of apple juice during fermentation. Ann. Rept. Long Ashton, I948, I82. cité par LUTHI(H) La rétrogradation malolactique dans les vins et les cidres, Rev. Ferm. Ind. alim, I957, I2, 9.
- (58) SALLES(J.B.v), OCHOA(S), Biosynthesis of dicarboxylic acids by carbon dioxide fixation. II. Further study of the properties of the "malic" enzyme of pigeon liver. Journ. Biol. Chem. I950, I87, 949 cité par LUTHI(H), la rétrogradation malolactique dans les vins et les cidres, Rev, Ferm, Ind, alim, I957, I2, II.
- (59) KORKES(S), de CAMILLO(A), OCHOA(S), Biosynthesis of dicarboxylic acid by carbon dioxyde fixation. IV. Isolation und properties of an adaptive "malic" enzyme from Lactobacillus arabinosus. Journ Biol. Chem. I950, I87, 89I. cité par LUTHI(H), La rétrogradation malolactique dans les vins et les cidres, Rev, Ferm, Ind, alim, I957, I2, I7.
- (59 bis) BARAGIOLA(W.J), GODET(Ch), Die Vergärung des Traubenmostes unter Parrafinöl Ztschr. für Gärungsphysiologie. IV. I9I4 8I. Cité par LUTHI(H), La rétrogradation malolactique dans les vins et les cidres, Rev, Ferm, Ind, alim, I957, I2, I8.
- (60) LAMBION(R) MESKHI(A). Les bactéries de la fermentation malolactique. Rev, Ferm, Ind, alim, I957, I2, I3I-I44.
- (6I) MARQUES GOMES(J.V), DA SILVA BABO(M.F) GUIMARES(A.F) Estudos, Notes et Relatorios. n°4 Comissão de Viticultura da Região dos Vinhos Verdes, I953, I7. Cité par LAMBION(R), MESKHI(A), Les bactéries de la fermentation malolactique. Rev, Ferm, Ind, alim, I957, I2, I3I-I44.

- (62) MIGULA: Syst.d.Bakt,1900,2,33.cité par LAMBION(R),MESKHI(A)
Les bactéries de la fermentation malolactique,Rev,Ferm,Ind,
alim,1957,12,131-144.
- (63) FORNACHON(J.C.M).The occurence of malo-lactic fermentation
in australian wines.L'existence de la fermentation malolac-
tique dans les vins Australiens,Australian.Journ,appl,Sci,
1957,8,120-129.
- (64) AMERINE(M.A).Food.Tech.Champaign.1950,4,177-81.cité par
FORNACHON(J.C.M).The occurence of malo-lactic fermentation
in australian wines.Australian.Journ,appl,Sci,1957,8,120-129
- (65) AMERINE(M.A)JOSLYN(M.A.) Table Wines:The Technology of their
Production in California(Univ.of.California Press) cité par
FORNACHON(J.C.M).The occurence of malo-lactic fermentation
in australian wines.Australian.Journ,appl,Sci,1957,8,120-129
- (66) CARR(J.G)(Research Station,Long Ashton,Bristol).Occurence
and activity of some lactic acid bacteria from apple juices,
ciders and perries(Présence et activité de quelques bacté-
ries lactiques de jus de pommes,de poires et de cidres)J.
Ins.Brew,1957,63,436.cité par LAMBION(R)Rev,Ferm,Ind,alim,
1958,13,83.
- (67) VAUGHN(R.H),TCHELISTCHEFF(A), (University of California,
Davis) Studies on the malic fermentation of California table
wines.(Etudes sur la fermentation malolactique des vins de
table Californiens.I.Introduction du problème)Am.J.of Enolo-
gy,1957,8,74.cité par LAMBION(R) Rev,Ferm,Ind,alim,1958,
13,126.
- (68) RADLER(F).(Bundesforschungsanstalt für Rebenzuchtung Geil-
weilerhag).Untersüchungen über die experimentelle Durchfüh-
rung des biologischen Säureabbaues.(Recherches sur la réali-
sation expérimentale de la fermentation malolactique).
Naturwissenschaften,1957,44,232.cité par LAMBION(R),Rev,
Ferm.Ind,alim,1958,13,87.

- (69) RADLER(F) (Bundesforschungsanstalt für Rebenzüchtung Geilweilrhof, Siebeldingen über Landau, Pfalz) Untersuchung des biologischen Säureabbaus im Wein. Isolierung und Charakterisierung vom Apfelsäure-abbauenden Bakterien. (Recherches sur la rétrogradation malolactique des vins. Isolement et caractérisation des bactéries). Archiv. für Mikrob. I958, 30, 64. cité par LAMBION(R) Rev. Ferm. Ind, alim, I958, I3, 264.
- (70) PEYNAUD(E), DOMERCQ(S) Présence démontrée de bactéries lactiques sur les raisins mûrs. C.R. Acad. Sci. I96I, 252, 3343-3344.
- (71) RADLER(F) Mikrobiologische Untersuchung des bakteriellen Säureabbaus im Wein. (Etude microbiologique de la rétrogradation des vins.). Naturwiss, I958, 2, 2I5. cité par LAMBION(R) Rev. Ferm. Ind, alim, I958, I3, 264.
- (72) RADLER(F) Untersuchung des biologischen Säureabbaus im Wein III. Die Energiequelle der Apfelsäure-abbauenden Bakterien. (Recherches sur la désacidification biologique des vins; III Sources d'énergie des bactéries décomposant l'acide malique Arch. für. Mikrob, I958, 3I, 224. cité par LAMBION(R) Rev. Ferm. Ind, alim, I958, I3, 264
- (73) RADLER(F) Untersuchung des biologischen Säureabbaus im Wein. IV. Über Faktoren, die das Wachstum der Apfelsäure-abbauenden Bakterien beeinflussen. (Recherches sur la désacidification biologique du vin. IV. Facteurs qui influencent la croissance des bactéries. Vitis, I958, 1, 288. cité par LAMBION(R) Rev. Ferm Ind, alim, I958, I3, 264.
- (74) FLESCH(P), JERCHEL(D). (Organisch-chemischen Institut der Universität Mainz). Neue Untersuchungen zum Abbau der L-Apfelsäure durch Bacterium gracile. (Nouvelles recherches sur l'utilisation de l'acide malique par B. gracile). Mitt, Rebe u Wein, I958 série A, 8, 30I. cité par LAMBION(R) Rev. Ferm, Ind, alim, I958, I3, 270.
- (75) CARR(J.G) (Research Station, Long Ashton, Bristol England) The vitamin requirements of lactic acid bacteria from ciders. (Besoins en vitamines des bacteries lactiques des cidres) Ant. van Leeuw. I958, 24, 63. cité par LAMBION(R). Rev. Ferm. Ind, alim; I958, I3, 265.

- (76) MILISAVLJEVIC(D). Sur la fermentation malolactique dans les vins. Ann. Sciences agronomiques de Belgrade, 1958, 11, 66-79.
- (77) RADLER(F) Archiv für Mikrobiologie, 1958, 30, 64. cité par Bull. Off. int. Vigne, Vin, 1961, 34, 113.
- (78) CARLES(J), LAMAZOU-BETBEDER(M), PECH(R), Existe-t-il une fermentation citramalique dans le vin. C.R. Acad. Sci. 1958, 246, 2160-2162.
- (79) BERGERET(J). Observations sur la fermentation malolactique des vins de Bourgogne récoltés en 1957. C.R. Acad. agr., 1958. 44, 673-677.
- (79 bis) BENVEGNIN(L) cité par FERRE(L) Traité d'oenologie bourguignonne. 1958. Ext. des Bull. Inst. nat. Appel. Origine. Vins et Eaux de vie. n° 57, 58, 59, 60, 61.
- (80) LUTHI(H), VETSCH(U). (Eidg. Versuchsanstalt Wädenswil) Beiträge zur Kenntnis des biologischen Säureabbaues in unvergorenen Obst- und Traubensäften. (Contribution à la connaissance de la rétrogradation malolactique des jus de fruits et de raisins fermentés ou non). Schweiz. Zeits. für Obst- und Weinbau, 1959, 68, n°6. Trav. Chim. Alim. Hyg. 1959. 50, 264. cité par LAMBION(R) Rev. Ferm. Ind., alim, 1960, 15, 32.
- (81) SUDRAUD(P), CASSIGNARD(R). Travaux récents sur la fermentation malolactique en Bordelais. Colloque Oenologique de Mâcon. Vignes et vins, 1959, 80, 10-13.
- (82) MICHEL(M) Etat actuel de nos connaissances sur la fermentation malolactique en Bourgogne. Colloque Oenologique de Mâcon. Vignes et Vins, 1959, 80, 18-21
- (83) SCHWARTZ(J) La fermentation malolactique dans les vins d'Alsace. Colloque Oenologique de Mâcon. Vignes et Vins, 1959, 80, 29-30.
- (84) BIDAN(P). Les germes de la fermentation malolactique. Colloque Oenologique de Mâcon. Vignes et Vins; 1959, 80, 33-38
- (85) DUPUY(P). Vignes et Vins, 1959, 80.
- (86) CORDONNIER(R). Vignes et vins, 1959, 80.

- (87) PEYNAUD(E),DOMERCQ(S).Possibilité de provoquer la fermentation malolactique en vinification à l'aide de bacteries cultivées.C.R.Acad,Agric.France.I959,45(15 Avril),355.
- (88) DOMERCQ(S),SUDRAUD(P),CASSIGNARD(R).Sur la possibilité d'obtenir rapidement la fermentation malolactique des vins. 84 ème Congrès des Sociétés Savantes.Dijon.I959.Ed.Gauthier-Villars, PARIS.239-245.
- (89) DUPUY(P),MELAMED(N).La croissance de Lactobacillus arabinosus dans le jus de raisin:influence du pH,de l'éthanol et d'un hydrolysat trypsique. 84 ème Congrès des Sociétés Savantes, Dijon,I959.Ed.Gauthier-Villars.Paris.263-274.
- (90) WOOLLEY(D.W)Etude sur la découverte,la purification et les propriétés chimiques de la Strepogénine.Bull.Soc.Chim.biol. supplément,I948 n° 11-12,IOI-II3.
- (91) HUSFELD(B).Rapport allemand à l'Off.Inter.Vigne.Vin sur les méthodes d'isolement;de culture et de classification des bactéries malolactiques.Bull;Off.Int.Vigne.Vin.I964,37,824-829.
- (92) WEBB(R.B),INGRAHAM(J.L) Amer.J.Enol.Vitic.I960,2,59.cité par PEYNAUD(E),DOMERCQ(S).C.R.Acad.Sci.I96I,252,3343.
- (93) BULLETIN D'INFORMATION DU MINISTERE DE L'AGRICULTURE.La flore malolactique des vins.Bull.Inf.n°I27,2 FevI963.
- (94) BENVEGNIN(L),CAPT(E),PIGUET(G).Traité de vinification.I95I, Payot,Lausanne.La maison rustique,Paris.
- (95) MICHOD(J),FELL(G).La fin de la fermentation malolactique,un moment critique de l'évolution du vin.Rev.Normande.Agric. Vitic.Arboric.I96I,I7,78-79.Lausanne.
- (96) OCHS(G)Le bacterium gracile est la cause de la maladie de la paralysie des pétioles sur les vignes de rendement et de table.Mitt.série A,IX,2 nov,I959.cité par Bull.Off.int.Vigne Vin.I96I,34,I23.

- (97) RUTTER(W.J), LARDY(H.A). Purification and properties of pigeon liver malic enzyme. J. Biol. Chem. 1958, 233, 374-382 cité par CARLES(J), LAMAZOU-BETBEDER(M), PECH(R). Ann. Tech. agric. 1961, 10, 61-71.
- (98) BARRE(P), GALZY(P). Etude d'une nouvelle bactérie malolactique. Ann. Tech. agric. 1960, 9, 331-343.
- (99) BREED(R.S), PEDERSON(C.S). The organisms causing rusty spot in cheddar cheese. Journ. of. Bact. 1938, 36, 667. cité par BARRE(P), GALZY(P). Ann. Tech. agric. 1960, 9, 331-343.
- (100) BARRE(P), GALZY(P). Etude d'un lactobacille homofermentatif isolé d'un vin. Ann. Technol. agric. 1962, 11, 121-130
- (101) PEYNAUD(E), DOMERCQ(S). Etude sur les bacteries lactiques des vins. Ann. Technol. agric. 1961, 10, 43-60.
- (102) RIBEREAU-GAYON(J). Cité par PEYNAUD(E), DOMERCQ(S). Ann. Techn. agric. 1961, 10, 47.
- (103) BREED(R.S), MURRAY(E.G.D), SMITH(N.R.) Bergey's manual of déterminative bacteriology. Williams and Wilkins Co., 7ème ed., 1957, Baltimore. cité par RIBEREAU-GAYON(J), PEYNAUD(E), Traité d'oenologie, 1961, Ch Béranger, Paris et Liège. 2, 465, 466.
- (104) PREVOT(A.R). Manuel de classification et de détermination des bacteries anaérobies. Masson, 1957, Paris. Cité par RIBEREAU-GAYON(J), PEYNAUD(E). Traité d'oenologie, 1961, Ch Béranger, Paris et Liège. 2, 465, 466.
- (105) RADLER(F). Sur les bacteries d'acide lactique du vin et la désacidification biologique. Vitis. Siebeldingen. 1962, n°3. Cité par Bull. Off. int. Vigne. Vin. 1963, 36, 629.
- (106) PEYNAUD(E), DOMERCQ(S), GUIMBERTEAU(G). Travail de classification des bactéries lactiques des vins. Intervention Symposium Inter. Bordeaux. Ann. Technol. agric. 1963, 12, n° hors série I
- (107) SYMPOSIUM INTERNATIONAL D'OENOLOGIE de Bordeaux 10 au 15 Juin. Ann. Technol. agric. 1963, 12, n° Hors série I.
- (108) MILISAVLJEVIC(D). Rapport Yougoslave à l'Office Int. Vigne Vin. Sur les méthodes d'isolement, de culture et de classification des bactéries malolactiques. Bull. Off. int. Vigne. Vin. 1964, 37, 374-384.

- (109) KRASSILNIKOV(N). Diagnostique des bactéries et actinomycètes. 1949, Moscou. Cité par MILISAVLJEVIC(D). Bull. Off. int. Vigne. Vin. 1964, 37, 381.
- (110) TESIC(Z). Les systèmes récents de classification des bactéries. Ann. Fac. agr. Novi-Sad. 1958, 2. cité par MILISAVLJEVIC(D) Bull. Off. int. Vigne. Vin. 1964, 37, 382.
- (111) TESIC(Z). Clé simplifiée pour la détermination des genres chez les bactéries et les actinomycètes. Agrohemija, 1962, 10. cité par MILISAVLJEVIC(D). Bull. Off. int. Vigne. Vin. 1964, 37, 383.
- (112) HOCHTRASSER(R). Ueber einige Bedingungen beim Lindwerden der Weine. Zürich. 1955. Cité par MILISAVLJEVIC(D). Bull. Off. int. Vigne. Vin. 1964, 37, 383.
- (113) FLORENZO(G), VERONA(O). Rapport Italien à l'Office. Int. Vigne Vin. Sur les méthodes d'isolement, de culture et de classification des bactéries malolactiques. Bull. Off. int.
- (114) RADLER(F) (Forschungs-Institut für Rebenzüchtung Geilweilerhof). Über die Milchsäurebakterien des Weines und den Biologischen Säureabbau. II. Physiologie und Ökologie der Bakterien. (Les bactéries lactiques du vin et la dégradation biologique. II. Physiologie et écologie des bactéries). Vitis 1963, 3, 207. Cité par LAMBION(R) Rev. Ferm. Ind. alim. 1963, 18, 137
- (115) FORNACHON(J.C.M). Travaux récents sur la fermentation malolactique. Symposium Int. Oenologie. Bordeaux. Ann. Technol. agric 1963, 12, n° hors série I.
- (116) SILVA BABO(M). Essais d'application des bactéries malolactiques aux vins verts. Intervention au Symposium Int. Oenologie. Bordeaux. Ann. Technol. agric. 1963, 12, n° hors série I.
- (118) FEDUCHY MARINO(E). Rapport Espagnol à l'Office. int. Vigne. Vin sur les Méthodes d'isolement, de culture et de classification des bactéries malolactiques. Bull. Off. int. Vigne. Vin. 1964, 37, 1273-1287.
- (119) VIANA MARQUES GOMEZ(J), FERREIRA DA SILVA BABO(M). Rapport Portugais à l'Office int. Vigne Vin. sur les Méthodes d'isolement, de culture et de classification des bactéries malolactiques. Bull. Off. int. Vigne. Vin. 1965, 38, 54-68.

- (120) PEYNAUD(E), DUPUY(P) Rapport Français à l'Office int.Vigne. vin. Sur les méthodes d'isolement, de culture et de classification des bacteries malolactiques. Bull. Off. int. Vigne. Vin. 1964, 37, 908-922.
- (121) CHAUVEY(J), BRECHOT(P), DUPUY(P), CROSON(M), IRRMANN(R). Evolution des acides malique et lactique dans la vinification par macération carbonique de la vendange. Ann. Technol. agric. 1963, 12, 237-246.
- (122) KOCH(R). Action antibiotique des levures à l'égard des bacteries. Brasserie et malterie de Belgique. 1953, 3, 250-253.
- (123) COOK(S), KREKE(W), GIERSCH(C), SCHROEDER(P). A growth-depressant substance from yeast. Science, 1941, 93, 616-617.
- (124) FLESCH(P), JERCHER(D). (Organisch-chemischen Institut der Universität Mainz). Ueber die Züchtung von Bacterium gracile in natürlichen L. Apfelsäure enthaltenden Nährmedien. (Sur la culture de Bacterium gracile dans les milieux naturels contenant de l'acide L-malique). Mitteilungen, Serie A, 1960, 10. Cité par LAMBION(R). Rev. Ferm. Ind. alim. 1961, 16, 63.
- (125) CASSIGNARD(R). Sélection des levures en vue de l'ensemencement des jus de raisin. Vigne et vins. 1964, 133, 33-37.
- (126) HARRIS(J.O), WATSON(W). (The Newcastle Breweries Ltd. Newcastle-upon-Tyne). Observations on some beer spoilage Lactobacilli. (Observations sur quelques Lactobacillus d'infection de la bière). J. Inst. Brew. 1960, 66, 151. Cité par LAMBION(R), Rev. Ferm. Ind. alim. 1960, 15, 67.
- (127) BENARD(P), JOURET(C). Essais de vinification. Comparaison entre trois techniques de vinification en rouge. (suite) Vignes et vins. 1962, 109, 7-11.
- (128) MELAMED(N). Détermination des sucres résiduels des vins, leur relation avec la fermentation malolactique. Ann. Technol. agric. 1962, 11, 5-32. et 1962, 11, 107-119.

- (I29) RADLER(F). (Forschungsinstitut für Rebenzüchtung Geilweilerhof). Über die Milchsäurebakterien des Weines und den biologischen Säuregehalt im Wein. (Les bacteries lactiques du vin et la dégradation malolactique. III. Méthodes de modification de l'acidité du vin). Vitis, 1963, 4, 62. Cité par LAMBION(R) Rev. Ferm. Ind. alim. 1964, 19, 133.
- (I30) BULLETIN D'INFORMATION DU MINISTERE DE L'AGRICULTURE. Actions bacteriennes dans les vins. Cité par La Journée vinicole. 1965, 39, n° 11430, 3 Juin.
- (I31) NEGRE(E). Contribution oenologique à l'étude des matières tannoïdes. C. R. Acad. Agric. 1939, 25, 647-652.
- (I32) NEGRE(E). Les matières tannoïdes et la composition des vins. Bull. Off. int. Vin. 1942, 15, 20-52. et Bull. Off. int. Vin. 1943, 16, 25-56.
- (I33) LABORDE(J). Cité par RIBEREAU-GAYON(J). Progrès agricole et viticole. 1939, 56, n° 5.
- (I34) RIBEREAU-GAYON(J). Traité d'oenologie. 1949, Ch Béranger, Paris et Liège.
- (I35) BANHIDI(Z.G). (Wenner-Gren Inst. Exper. Biol. Univ. Stockholm, Sweden). Activation of the disulfide forms of thiamine and its phosphates as growth factor for Lactobacillus. (Activation des formes disulfure de la thiamine et de leurs phosphates comme facteurs de croissance pour Lactobacillus fermenti). J. of. Bact. 1960, 79, 181. Cité par LAMBION(R). Rev. Ferm. Ind. alim. 1961, 16, 25.
- (I36) BANHIDI(Z.G). (Wenner-Gren Inst. Exp. Biol., Univ. Stockholm, Sweden). Growth promotion of some heterofermentative Lactobacilli with different derivatives of thiamine. (Activation de la croissance de quelques Lactobacilli hétérofermentatifs avec différents dérivés de la thiamine). Arkiv för Kemi. 1960, 15, 229. Cité par LAMBION(R), Rev. Ferm. Ind. alim 1961, 16, 25.
- (I37) PEYNAUD(E). Cité par RIBEREAU-GAYON(J), PEYNAUD(E) Traité d'Oenologie, 1961, Ch Béranger. Paris et Liège, 2, 495.

- (I38) MAR MONUX(D). Organismos destructores de acidos en el vino (Organismes destructeurs des acides dans le vin) Sem.viti-vin., Esp. I963, 904, 4047-4051. Cité par Bull. Off. int. Vigne. Vin. I964, 37, 79.
- (I39) DU PLESSIS(L.W). The microbiology of south african wine-making. Part V. Vitamin and amino acid requirements of lactic acid bacteria from dry wines. (Microbiologie de la vinification en Afrique du Sud. Vème partie: besoins des bacteries de l'acide lactique des vins secs en vitamines et aminoacides). S. Afric. Journ. Sci., Afrique du Sud, I963, 6, 485-494. Cité par Bull. Off. int. Vigne. Vin. I964, 37, 532-533.
- (I40) LAFON(J). Cité par PEYNAUD(E), DOMERCQ(S). Ann. Technol. agric I961, 10, 43-60.
- (I41) BLOCK, BOLLING. Cité par RIBEREAU-GAYON(J), PEYNAUD(E), Traité d'oenologie. I961, Ch Béranger, Paris et Liège, 1, 205.
- (I42) CARLES(J), LAMAZOU-BETBEDER(M), PECH(R). Etat actuel de nos connaissances sur quelques actions bacteriennes dans les vins. Ann. Technol. agric. I961, 10, 61-71.
- (I43) KONDO(G.E), FADENKO(P.S). Rôle des bacteries malolactiques pendant l'élaboration du "Jerez". Vinod. vinograd. U.R.S.S. I964, 2, 26-29. Cité par Bull. Off. int. Vigne. Vin. I964, 37, 658.
- (I44) FLEMING. Cité par PEYNAUD(E), DOMERCQ(S). Ann. Technol. agric I961, 10, 58.
- (I45) CORDONNIER(R). La fermentation malolactique des vins. Prog. agric et vitic. I961, 78, 118-122.
- (I46) VILAR ROSA DA COSTA(A). La fermentation malolactique et les vins du Dao. Agricultura, I961, n°11. Cité par Bull. Off. int. Vigne. Vin. I962, 35, 417
- (I47) RADLER(F). La formation d'acétoïne et de diacétyl par les bacteries dans la désacidification biologique. Vitis, I962, n°3. Cité par Bull. Off. int. Vigne. Vin. I963, 36, 102.

- (I48) RADLER(F). (Forschungs-Inst.f.Rebenzüchtung, Geilweilerhof, Siebeldingen, Landau/Pfals). Die Bildung von Aceton und Diacetyl durch die Bakterien des biologischen Säureabbaus. (La synthèse d'acétoïne et de diacétyl par les bactéries de la fermentation malolactique). Vitis. 1963, 3, 136. Cité par LAMBION(R), Rev.Ferm.Ind.alim. 1962, 17, 206.
- (I49) MAYER(K). Rapport Suisse à l'Off.int.Vigne.Vin. Sur l'emploi des antiseptiques dans les vins en association avec l'anhydride sulfureux. Bull.Off.int.Vigne.Vin, 1965, 38, 525-526.
- (I50) WEBB(R.B), INGRAHAM(J.L). Les fermentations malolactiques provoquées. Amer.Journ.of Enol.and Vitic.Vol.II.n°2. Cité par Bull.Off.int.Vigne.Vin. 1961, 34, 112.
- (I51) FLESCH(P), JERCHEL(D). (Org.-Chem.Inst., Univ.Mainz). Die Gefriertrocknung von Bacterium gracile. (La Lyophilisation de Bacterium gracile). Mitt., Série A. Rebe u. Wein. 1961, 11, 12. cité par LAMBION(R). Rev; Ferm.Ind.alim. 1961, 16, 211.
- (I52) FELL(G). Etude sur la fermentation malolactique du vin et les possibilités de la provoquer par ensemencement. Annuaire agricole de la Suisse. 1961, n°634, 249-264.
- (I53) FLESCH(P). Réalisation de la fermentation malolactique dans le vin avec des bactéries graciles "immobiles". Mitt. XI, A/4. 1961. Cité par Bull.Off.int.Vigne.Vin. 1961, 34, 93.
- (I54) FLESCH(P). (Organisch-chemischen Institut der Universität Mainz). Die Durchführung des Biologischen Säureabbaus in Wein mit " ruhenden " Gracile-Bakterien. (La réalisation de la fermentation malolactique dans le vin à l'aide de bactéries Gracile non proliférantes). Mitt. Série A, Rebe u. Wein. 1961, 11, 173. Cité par LAMBION(R). Rev.Ferm.Ind.alim. 1962, 17, 26.
- (I55) BEZZEGH(Th). L'importance des bactéries lactiques en oenologie. Weinberg und Keller, 1963, n°10. Cité par Bull.Off.int.Vigne.Vin. 1963, 36, 1459.
- (I56) FELL(G). Rapport Suisse à l'Off.Int.Vigne.Vin. sur les méthodes d'isolement, de culture et de classification des bactéries malolactiques. Bull.Off.int.Vigne.Vin. 1964, 37, 1175-1180.

- (I57) BEZZEGH(Th)(Zürich) Die bedeutung von Milchsäure-bakterien in der Oenologie.(La signification des bacteries lactiques en oenologie).Weinb.und.Keller.I963,10,470.Cité par LAMBION(R).Rev.Ferm.Ind.alim.I964,19,104.
- (I58) KUNKE RALPH(E),OUGH(C.S),AMERINE(M.A).Introduction of malolactic fermentation by inoculation of must and wine with bacteria.(Introduction de la fermentation malolactique par inoculation du moût et du vin avec des bacteries).American Journal of Enology and Viticulture, Etats-Unis.I964,4,178-183.Cité par Bull.Off.int.Vigne.Vin.I965,38,421.
- (I59) NEGRE(E).La fermentation malolactique dans le Midi.Progrès agricole et viticole.I962,79,59-63.
- (I60) DITTRICH(H).Essais de décomposition de l'acide malique avec une levure de la famille des Schizosaccharomyces.(Die Wissens,I963,n°8).Cité par Bull.Off.int.Vigne.Vin.I963,36,1230.
- (I61) BOUFFARD.Intervention au Colloque Oenologique de Mâcon. Vigne et Vins.I959,80,33.
- (I62) PEYNAUD(E).Les fermentations d'achèvement.Bulletin technique d'information du Ministère de l'Agriculture.I965,n°196,89-106.
- (I63) LAFON(J)Remarques sur les vins blancs des Charentes destinés à la production du Cognac.Communication aux Assises Triennales de l'Union Nationale des Oenologues à Nantes.Bull. Union.nat.Oenologues.n°20.42-44.I965.
- (I64) ROSENSTEIN(E)Problèmes de vinification en pays chauds.Bull. Off.int.Vigne.Vin.I965,38,164-184
- (I65) KADAR(G).La régulation de l'acidité comme moyen d'obtenir des vins de qualité.Publ.Acad.Horti-Viticult.,I964,n°2, 284-293.cité par Ind.Agric.alim.I965,82,236.
- (I66) SCHANDERL(H).Rapport Allemand à l'Off.Int.Vigne.Vin.sur les phénomènes d'oxydo-réduction au cours de la maturation et du vieillissement du vin et procédés pour le modifier. Bull.Off.int.Vigne.Vin.I964,37,490-497.

- (I67) INGRAM(M).L'action antimicrobienne de l'anhydride sulfureux.
Rev.Ferm.Ind.alim.I958,I3,I79-I88.
- (I68) SCARDOVI(V).Annal.di.Microbiol,I95I,4,I3I.cité par LAMBION
(R).Rev.Ferm.Ind.alim.I958,I3,I84.
- (I69) SCARDOVI(V).Annal.di.Microbiol.I952,5,5.cité par LAMBION(R)
Rev.Ferm.Ind.alim.I958,I3,I84.
- (I70) SCARDOVI(V).Annal.di.Microbiol.I953,5,I40.cité par LAMBION
(R).Rev.Ferm.Ind.alim.I958.I3,I84.
- (I7I) SCARDOVI(V).Annal.di.Microbiol.I956.7,30.cité par LAMBION(R)
Rev.Ferm.Ind.alim.I958,I3,I84.
- (I72) SCAZZOLA(E).Remarques sur les vinifications de I963.Midi
vinicole.I964.68,n°4II9.
- (I73) NEGRE(E).Contributions à l'étude des matières tannoïdes du
vin.Thèse.Doct.es Sci.Physiques.Montpellier.I944.Impr.des
dernières nouvelles de Strasbourg.Strasbourg.
- (I74) JENSEN(H).Recherches sur le pouvoir bactericide des vins
rouges.Thèse.Doct.mention pharmacie.Bordeaux.I954.Impr.
Drouillard.Bordeaux.
- (I75) SCHERBJournée vinicole.28 Août I953. Le pouvoir bactéricide
du vin.Cité par Bull.Off.int.Vin.I953,26,I24.
- (I76) SCHANDERL(H).L'influence des polyphénols et des substances
tannantes sur la physiologie de la levure de vin et la
valeur du test pH 7 pour la sélection des moussoux de base.
Mitt.Rebe.u.Wein.I962.I2,265.Cité par Bull.Off.int.Vigne.
Vin.I963,36,373.
- (I77) BOULARD.Sur un procédé permettant d'arrêter à volonté les
fermentations à n'importe quel moment.C.R.Acad.agric.I926,
I2,6I5-620.
- (I78) MALVEZIN(Ph)Sur la possibilité de préserver les vins des
fermentations secondaires au moyen de "vaccins" préparés à
l'aide de cultures de saccharomyces ellipsoïdeus et sur
quelques cas de non efficacité apparente de cette méthode.
Bull.Soc.chim.I927.4I,42,7I3-7I7.

- (I79) SEIGNEURIN(R),CARRAZ(G),ROUX(A),SYNDICO(S).De l'action bactériostatique in vitro des extraits de levure de bière et de bacteries du vinaigre.Ann.Inst.Pasteur.I947,73,81-82
- (I80) WAKSMAN(A).Antagonismes microbiens et substances antibiotiques.I948.Sedes.Paris.
- (I81) CARBALLO CAABEIRO(J).Les antibiotiques en oenologie.Agricultura.Madrid.Cité par Bull.Off.int.Vin.I953,26,109-110.
- (I82) LAFOURCADE(S)Contribution à l'étude des activeurs et des inhibiteurs de la fermentation alcoolique des moûts de raisin.Ann.Technol.agric.I954,3,283-332 et Ann.technol.agric.I955,4,5-66.
- (I83) STRANDSKOV(F.B),BOCKELMANN(J.B).The Effect of Yeast Strain on Bactérial Growth in Brewery Fermentations.L'influence de la variété de levure sur le développement bacterien dans les fermentations de brasserie.Wallerstein.Labor.Com.I958,21,49-58.
- (I84) GRAY(P);Some Advances in Microbiological Control for Beer Quality.Quelques progrès dans le contrôle microbiologique de la qualité de la bière.Wallerstein.Lab.Comm.I962, August I66-I79.
- (I85) BRUGIRARD(A),ROQUES,DIXONNE.L'acide malique du raisin et du vin.Bull.technique de Chambre d'Agriculture et Sté de recherches et d'expérimentations agricoles des Pyrénées-Orientales.I965.34.I4-27.
- (I86) FLANZY(M),CAUSERET(J),HUGOT(D),GUERILLOT(J).Contribution à l'étude des boissons alcooliques.II.Etude comparée de différents vins et de diverses techniques oenologiques.Ann.Technol.agric.I955,4,359-380.
- (I87) MORGAN(A.F),NOBLES(H.L),WIENS(A),MARSH(G.L),WINKLER(A.J)
The B Vitamins of California Grape Juices and Wines.Food Res.,I939,4,217.Cité par FLANZY(M),CAUSERET(J),HUGOT(D),GUERILLOT(J).Ann.Technol.agric.I955,4,359-380.
- (I88) PERLMAN(L),MORGAN(A.F).Stability of B Vitamins in Grape Juices and Wines.Food.Res.I945,10,334. Cité par FLANZY(M),CAUSERET(J),HUGOT(D),GUERILLOT(J).Ann.Technol.agric.I955,4,359-380.

- (I89) LAFOURCADE(S), PEYNAUD(E). Sur la teneur des vins en riboflavine. Rev. Ferm. Ind. alim. 1957, 12, 9-14
- (I90) PEYNAUD(E) Neue Gegebenheiten bezüglich des biologischen Säureabbaues. Mitteilungen Klosterneuburg. 1955, 5, 183. Cité par LAFOURCADE(S), PEYNAUD(E). Rev. Ferm. Ind. alim. 1957, 12, 9-14.
- (I91) NEGRE(E). Les méthodes actuelles de vinification sont elles défavorables à la qualité du vin et par suite, à la santé des consommateurs. Ext du Progrès agricole et viticole. 1959, n°17. 123 et suiv. Cité par Bull du C.E.T.A.V du Layon. 1959, n°4. Sep
- (I92) PEYNAUD(E), LAFON-LAFOURCADE(S), DOMERCQ(S) Besoins nutritionnels de soixante-quatre souches de bactéries lactiques isolées de vins. Bull. Off. int. Vigne. Vin. 1965, 38, 945-958.
- (I93) GENDRON(C) Influence du pressurage sur le taux d'azote organique dans les moûts. Rev. Ferm. Ind. alim. 1965, 20, 201-205.
- (I93 bis) GENDRON(C) Le pressurage des raisins à la vendange. Etude biochimique et observations des repercussions sur la fermentation alcoolique. Revue Française d'Oenologie (sous presse)
- (I94) FERNBACH. Recueil de conférences de FERNBACH à l'Institut Pasteur. 1927-1928. aimablement communiqué par HUMEAU(G).
- (I95) BOULANGER(P), BISERTE(G). La chromatographie de partage. Exposés annuels de biochimie médicale. 1950, Masson et Cie Paris, 53-21.
- (I96) CHEFTEL(R.I), MUNIER(R), MACHEBOEUF. Bull. Soc. Chim. Biol. 1951, 33, n°7.
- (I97) MICHOD(J) Méthode simple de recherche de l'acide malique dans les vins. Station fédérale d'essais agricoles de Lausanne.
- (I98) JAULMES(P). Analyses des vins. Poulain. Montpellier. 1951.
- (I99) CONVENTION INTERNATIONALE POUR L'UNIFICATION DES METHODES D'ANALYSE ET D'APPRECIATION DES VINS. Off. Int. Vigne. Vin. II rue Roquépine Paris. 1962 et mises à jour.
- (200) RIBEREAU-GAYON(J), MAURIE(A). Bull. int. Vin. 1942, 15, n°150, 60. cité par RIBEREAU-GAYON(J), PEYNAUD(E) Analyse et contrôle des vins. 1958, Ch Beranger, Paris et Liège.

- (201) RIBEREAU-GAYON(J), PEYNAUD(E). Analyse et contrôle des vins 1958, Ch Béranger. Paris et Liège.
- (202) FRESENIUS(W), GRUNHUT(L). Zeits für analytische chemie. 1921, 60, 406. Cité par RIBEREAU-GAYON(J), PEYNAUD(E) Analyse et contrôle des vins. 1958. Ch Béranger. Paris et Liège.
- (203) SCHANDERL(H), STANDEMEYER(T). Comment reconnaître la richesse excessive en polyphénols des vins destinés à être transformés en mousseux. Wein. Rebe. 1961, n°97. cité par Bull. Off. int. Vigne. Vin. 1962, 35, 1697-1698.
- (204) FERRE, MICHEL. Ann. Fals. Fraudes. 1933, p.25. Cité par JAULMES(F) Analyses des vins. Poulain. Montpellier. 1951
- (205) REGULEX. Notice 3. A. Labo-Centre. 195 Av de la Libération Clermont Ferrand.
- (205 bis) TZYB(T.S) Sur la fermentation malolactique dans le Jerez. Vinodelie i Vinogradarstvo. U.R.S.S. 1965, 2, 18-20. Cité par Bull. Off. int. Vigne. Vin. 1965, 38, 663.
- (206) MARECA-CORTES(I). Sur les phénomènes Redox oenologiques. Ind. agric. alim. 1962. 79, 829-838.
- (207) CORDONNIER(R). Rapport Français à l'Off. int. Vigne. Vin. sur l'Etude des protéines et des substances azotées. Bull. Off. int. Vigne. Vin. 1966, 39, 1475-1489.
- (208) RIBEREAU-GAYON(J), PEYNAUD(E). Acides aminés des moûts et alcools supérieurs des vins. 84 ème Congrès des Sociétés savantes. Dijon. Gauthier-Villars. Paris. 1960, 247-251.
- (209) LAFON-LAFOURCADE(S), PEYNAUD(E). Composition azotée des vins en fonction des conditions de vinification. Ann. Technol. agric. 1961, 10, 143-160.
- (210) CARLES(J), LAMAZOU-BETBEDER(M), PECH(R). Les acides aminés libres du vin. C.R. Acad. Sci. 1958. 24 Fev. 1254-1257.
- (211) RIBEREAU-GAYON(J), MAURIE(A). Les composés phénoliques du vin. Bull. Off. int. Vin. 1942, 15, 60-76.
- (212) MASQUELIER(J), POINT(G). Le leucoanthocyane des cépages blancs de vitis vinifera. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux. 1956, 95; 6-11.

- (2I3) PRILLINGER(F).(Klosterneuburg).Uber die stickstoffhaltigen Substanzen im Wein.(Sur les substances contenant de l'azote dans les vins).Mitt.Rebe u.Wein.Klost.I957,7, I38.Cité par LAMBION(R).Rev.Ferm.Ind.alim.I958,I3,42.
- (2I4) TERCELJ(D).Etudes des composés azotés du vin.Ann.Technol. agric.I965,I4,307-3I9.
- (2I5) TERCELJ(D).La diminution des composés azotés dans le vin par différents collages.Ann.Technol.agric.I966,I5,73-77.
- (2I6) OPARINE(A.I)Biochimie du vin.Bull.Off.int.Vigne.Vin. I963,36,I30I-I3IO.
- (2I7) SCHAEFFER(Y).Les ferments.Masson.Paris.I929.
- (2I8) PEYNAUD(E),LAFOURCADE(S).Les équilibres vitaminiques chez les levures.Ann.Institut Pasteur.I958,94,78-88.
- (2I9) SCHOPFER(W.H).Plants and vitamins,Chronica Botanica Company,édit,Waltham.I949. Les équilibres vitaminiques chez les microorganismes.VII Congrès International de Botanique.Stockholm,I950. Données nouvelles relatives à la biosynthèse de quelques vitamines en relation avec l'équilibre vitaminique.VI Congrès international de Microbiologie. SCHOPFER(W.H),GROB(E.C).Bull.Soc.Chim. biol.I954,36,II95. SCHOPFER(W.H),POSTERNAK(Th),HAENNI (H).Helv.Physiol.Acta.I954,I2,30.cité par PEYNAUD(E), LAFOURCADE(S) Ann.Institut Pasteur.I958,94,78-88.
- (220) PEYNAUD(E),LAFON-LAFOURCADE(S).Constitution azotée des levures en fonction des conditions de nutrition.Qual. Plant et Mat.Vegetabiles.I963,2,365.Cité par LAMBION(R) Rev.Ferm.Ind.alim.I964,I9,6I.
- (22I) RIBEREAU-GAYON(J),PEYNAUD(E),GUIMBERTEAU(G).Formation des produits secondaires de la fermentation alcoolique en fonction de l'alimentation azotée des levures.C.R. Acad.Sci.I959,248,749-75I.
- (222) BIZEAU(C) Etude des facteurs limitant la croissance des levures dans les moûts de "clairette" et de "muscat blanc à petits grains".Ann.Technol.agric.I963,I2,247-276

- (223) FERENZY(S). Etudes des protéines et des substances azotées
Plan de travail à l'intention des rapporteurs nationaux.
Bull. Off. int. Vigne. Vin. I966, 429, I3II-I336.
- (224) WEISS(H), ROUSSET(A), MAILLARD(M.T), BONNET(R). L'évolution
qualitative et semi-quantitative des acides aminés au
cours de la fermentation des moûts de raisin provenant de
cépages d'Alsace. C.R. Acad. Sci. I960, I5 Fev. I322-I324.
- (225) POUX(Ch), FLANZY(C), FLANZY(M). Les levures alcooliques dans
les vins; protéolyse et protéogenèse. Ann. Technol. agric.
I964, I3, 5-I8. Ann. Technol. agric. I964, I3, 283-300. Ann.
Technol. agric I965, I4, 35-48.
- (226) SERVIERE(Ph). Valeur biologique de l'acide malique: nouvelle
notion en biologie. Aliment et Vie. I962, (50)n°7,8,9, I9I-I95.
- (227) SUDRAUD(P). Le fer dans les vins. Journal de France des Appel
lations d'origine. I965, 22, n°248.
-

DEUXIEME THESE

Proposition donnée par la Faculté

ANALYSE DE MELANGES D'AMINO - ACIDES

PAR

CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

Vu :

Le Président de la Thèse

J.M. DUNOYER

Vu :

Le Directeur de la Thèse

G. DEBRAUX

Vu et permis d'imprimer :

Référence n° 452

Nantes le 30 Mai 1967,

Le Recteur de l'Académie de Nantes

M. SCHMITT

Vu et approuvé :

Le Doyen

de la Faculté des Sciences

G. BRILLOUET

